

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION " PHARMACIE "

PAR

Jean-Jacques HADOT

PHARMACIEN

ASSISTANT A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY

EX-PRÉPARATEUR A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

DIPLOMÉ DE SÉROLOGIE

DIPLOMÉ D'ÉTUDES SUPÉRIEURES DE CHIMIE BIOLOGIQUE

DIPLOMÉ DE MICROBIOLOGIE (UNIVERSITÉ) ET DE PHYTOPHARMACIE

né le 10 Juillet 1926, à CHALONS-SUR-MARNE

Modifications apportées à l'Action Antibiotique des Sulfamides par leur Association avec Divers Composés Chimiques

Travail du Laboratoire de Chimie

Soutenue le 26 JANVIER 1951, devant la Commission d'Examen

Président MM. KAYSER

Juges } MARCHAL
M^{lle} BESSON

Digitized by the Internet Archive
in 2026

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

POUR OBTENIR

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy

MENTION " PHARMACIE "

PAR

Jean-Jacques HADOT

PHARMACIEN

ASSISTANT A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY
EX-PRÉPARATEUR A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

DIPLOMÉ DE SÉROLOGIE

DIPLOMÉ D'ÉTUDES SUPÉRIEURES DE CHIMIE BIOLOGIQUE
DIPLOMÉ DE MICROBIOLOGIE (UNIVERSITÉ) ET DE PHYTOPHARMACIE

né le 10 Juillet 1926, à CHALONS-SUR-MARNE

Modifications apportées à l'Action Antibiotique des Sulfamides par leur Association avec Divers Composés Chimiques

Travail du Laboratoire de Chimie

Soutenue le 26 JANVIER 1951, devant la Commission d'Examen

Président MM. KAYSER

Juges { MARCHAL
M^{lle} BESSON

THÈSE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

le Titre de Docteur de l'Université de Nancy
MENTION "PHARMACIE"

Jean-Jacques HADOT

PHARMACIEN

à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Nancy



Modifications apportées à l'Action Antidiabétique
des Sulfamides par leur Association
avec Divers Composés Chimiques

Travail du Laboratoire de Chimie

Soutenu le 26 Février 1951 devant la Commission d'Examen

M. KAYSER
M. HADOT
M. BENOIT

UNIVERSITE DE NANCY
FACULTE DE PHARMACIE

PERSONNEL ENSEIGNANT

DOYEN :

M. G. RICHARD

ASSESSEUR :

M. A. MEUNIER

PROFESSEURS :

MM.	DOURIS R.		Toxicologie et analyse chimique
	MEUNIER A.		Pharmacie Galénique
Mlle	FRANCOIS M.TH;		Matière Médicale
	KAYSER F.		Chimie
	RICHARD G.		Pharmacie chimique
	FRANQUET R.		Botanique
	MARCHAL J.G.		Microbiologie

MAITRES DE CONFERENCES

MM.	STEIMETZ E.		Sciences naturelles
	JACQUEMAIN R.		Sciences physiques

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

M.	MEUNIER A.		Hydrologie
Mlle	FRANCOIS M.TH.		Hygiène
MM.	KAYSER F.		Pharmacodynamie
	RICHARD G.		Chimie organique
	FRANQUET R.		Cryptogamie
	MARCHAL J.G.		Parasitologie
	ROBLLOT, Professeur à la		
	Faculté de Droit		Déontologie
	STEIMETZ E.		Mycologie; Minéralogie
	JACQUEMAIN R.		Chimie analytique
	BERNANOSE A.		Physique

CHEFS DE TRAVAUX

Mme	LASSEUR A.		Microbiologie, Parasitologie
Mlle	BESSON S.		Chimie biologique
MM.	BLOCH J.M.		Chimie
	MANGENOT F.		Micrographie
	MIRJOLET M.		Sciences Pharmaceutiques
	BERNANOSE A.		Physique
	THUILLIER J.		Chargé de Travaux, Physique

PROFESSEUR HONORAIRE

M. CORDEBARD Henri

MAITRE DE CONFERENCES HONORAIRE

M. VERNIER

SECRETARIAT

M. RADUREAU Pierre - Secrétaire

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend ni les approuver ni les im-
pro-
ver.

A ma Grand'mère,

A mes Parents,

A ma Femme.

A notre Maître et Président de Thèse,
Monsieur le Doyen KAYSER,
Professeur de Chimie,

A nos Juges :

Monsieur le Professeur MARCHAL,
Professeur de Microbiologie,

Mademoiselle BESSON, Chef de Travaux
Pratiques de Chimie Biologique,

A tous nos Maîtres de la Faculté de Nancy,
et à nos anciens Professeurs de l'Ecole
Préparatoire de Reims.

En témoignage de nos sentiments
reconnaissants.

TABIE DES MATIERES

Avant-propos Page 1

.

CHAPITRE I Page 2

GENERALITES SUR LES ASSOCIATIONS MEDICAMENTEUSES, EN PARTICULIER SUR CELLES RENFERMANT UN SULFAMIDE

--- : ---

CHAPITRE II

TECHNIQUES SUIVIES DANS NOS RECHERCHES

A - Choix du milieu de culture	Page 10
B - Choix du microorganisme	Page 10
C - Ensemencement	Page 11
D - Matériel utilisé	Page 12
E - Préparation des solutions de sulfamide ou d'autres agents	Page 12
F - Mesure de développement microbien	Page 12
G - Choix du sulfamide	Page 14
H - Choix de l'agent à associer au sulfamide	Page 16
I - Technique de l'essai in vitro	Page 18
J - Technique de l'essai in vivo	Page 19

--- : ---

CHAPITRE III

ASSOCIATION DE CORPS A FONCTION PHENOL AVEC LES SULFAMIDES	Page 22
---	---------

A - Effet du <u>thymol</u>	Page 24
B - Effet de <u>l'acide salicylique</u> (comparaison des effets de <u>l'acide salicylique</u> à ceux des corps chimiquement voisins).	Page 27
Action de <u>l'acide salicylique</u>	Page 27
Essais in vivo de l'association salicylate P. thiazomide	29
Action de <u>l'acide benzoïque</u>	Page 31
Action de <u>l'acide acétyl salicylique</u>	Page 33

Action de l'acide <u>gentisique</u>	Page 35
Action de l'acide <u>para-amino-salicylique</u>	Page 37
C - Effet du <u>tanin</u>	Page 39
D - Conclusion.	Page 40

--- : ---

CHAPITRE IV

ASSOCIATION DE CERTAINS REDUCTEURS AVEC LES SULFAMIDES P. 41

-----+

A - Effet du <u>méthylène sulfoxyate de sodium</u>	Page 41
B - Effet de <u>l'Arsénite de sodium</u>	Page 42

--- : ---

CHAPITRE V

ASSOCIATION DE CORPS OXYDANTS AVEC LES SULFAMIDES Page 44

A - Effet du <u>chlorate de potassium</u>	Page 44
B - Effet de <u>la chloramine T</u>	Page 50
C - Effet de <u>l'iodate de potassium</u>	Page 51
D - Effet du <u>nitrate de potassium</u>	Page 52
E - Effet de <u>l'arséniate de sodium</u>	Page 52
F - Effet du <u>permanganate de potassium</u>	Page 53
G - Effet du <u>persulfate d'ammonium</u>	Page 54
H - Effet du <u>perborate de sodium</u>	Page 54
I - Conclusion.	Page 55

--- : ---

CHAPITRE VI

ASSOCIATION DE CERTAINS COLORANTS AVEC LES SULFAMIDES P.56

A - Effet de <u>la gonacrine</u>	Page 56
B - Effet du <u>bleu de méthylène</u>	Page 57

--- : ---

CHAPITRE VII

ASSOCIATION DE CERTAINES VITAMINES AVEC LES SULFAMIDES	Page 59
--	---------

A - Effet de <u>l'acide ascorbique</u>	Page 60
B - Effet de <u>la thiamine</u>	Page 61
C - Effet de <u>la riboflavine</u>	Page 63
D - Conclusion.	Page 64

--- : ---

CHAPITRE VIII

ASSOCIATION DE COMPOSES CHIMIQUES DIVERS AVEC LES SULFAMIDES	Page 64
---	---------

A - Effet du <u>chlorure mercurique</u>	Page 64
B - Effet de <u>l'urée et de la sulfo-urée</u>	Page 66
C - Effet des <u>acides nucléiques</u>	Page 68
Conclusion générale	Page 69
Index bibliographique alphabétique	Page 74

Lors de notre entrée dans son Laboratoire, Monsieur le Doyen KAYSER nous a proposé de poursuivre l'étude commencée par Jacques POUCHOL, qui fut notre bienveillant aîné à Reims. POUCHOL avait étudié les modifications apportées à l'action antibiotique des sulfamides par leur association avec certains corps à fonction phénol : le Phénol, l'Hydroquinone, la Résorcine, le Pyrogallol, la Phloroglucine; notre ami André EHRWEIN a cherché à mettre en évidence les modifications produites dans le métabolisme bactérien par l'association des phénols aux sulfamides.

Avant d'entrer dans l'exposé du sujet de notre thèse, il nous est particulièrement agréable d'exprimer à nos Maîtres nos remerciements et notre profonde reconnaissance.

Les nombreux conseils que nous a prodigués Monsieur le Doyen KAYSER avec beaucoup de sollicitude nous ont été très précieux. Sa haute compétence et ses avis judicieux nous furent toujours d'un grand secours. Notre Maître a suivi avec bienveillance et une attention soutenue notre travail; nous le prions de trouver ici l'expression de toute notre gratitude pour l'intérêt qu'il a bien voulu nous porter.

Monsieur le Professeur MARCHAL a su, par un enseignement riche et vivant nous initier à la Bactériologie. C'est grâce à la qualité des notions qu'il nous a inculquées que nous avons pu mener à bien ce travail. Qu'il nous permette de lui témoigner ici notre sincère reconnaissance.

Nous savons un gré infini à Mademoiselle BESSON qui nous a toujours réservé le plus cordial accueil et qui n'a cessé de nous donner des marques du bienveillant intérêt qu'elle portait à nos travaux.

C H A P I T R E I

GENERALITES SUR LES ASSOCIATIONS MEDICAMENTEUSES EN PARTICULIER SUR CELLES RENFERMANT UN SULFAMIDE.

---- : ----

Les associations médicamenteuses ont été, inconsciemment, les premières formes employées dans l'art de guérir; l'administration de corps purs était exceptionnelle dans la thérapeutique jusqu'à une époque relativement récente.

Beaucoup de cliniciens préfèrent, aujourd'hui encore, les préparations galéniques obtenues à partir des produits naturels, à leurs principes constitutifs isolés grâce aux progrès de la chimie.

Lorsqu'on administre deux médicaments simultanément, ou à des époques assez rapprochées pour que le premier d'entre eux soit encore présent quand le deuxième est offert, il peut arriver que leurs effets se combinent, l'effet du premier médicament étant augmenté ou diminué par le deuxième : on a affaire à des phénomènes de synergie ou d'antagonisme.

Ces notions sont d'ailleurs assez relatives puisqu'on peut observer, selon les doses et, le cas échéant, selon les modes d'introduction, tantôt des actions synergiques, tantôt des actions antagonistes.

D'après le Professeur HAZARD (36) une substance est dite "synergique d'une autre lorsqu'elle augmente les effets de celle-ci en rapidité, en intensité, en durée, par quelque mécanisme que ce soit".

On peut distinguer une synergie additive, qui se produit généralement lorsque les deux médicaments appartiennent à un même groupe pharmacologique et une potentialisation lorsqu'ils appartiennent à des groupes différents soit par leur nature pharmacologique, soit par leur action. Un exemple classique, utilisé en clinique, réside dans l'association d'un médicament hypnotique (un barbiturique, par exemple) avec un antipyrétique - analgésique tel que le pyramidon.-

Ces notions de synergie ont été étudiées et codifiées par BURGI et son école (8) : l'introduction simultanée dans l'organisme de deux médicaments appartenant au même groupe pharmacologique principal, amène un effet supérieur à la somme des actions des deux constituants pris isolément lorsque ces deux médicaments appartiennent à des sous-groupes pharmacologiques différents (synergie renforçatrice). - BURGI a supposé que cela provient, dans beaucoup de cas, du fait que ces médicaments agissent soit sur des cellules différentes, soit en des endroits différents d'une même cellule.-

Lorsque les deux médicaments introduits simultanément dans l'organisme agissent de la même manière sur les mêmes cellules, leurs effets s'ajoutent simplement (synergie additive). (130)

Malgré ce que ces règles ont d'arbitraire et d'incertain, les lieux précis d'action des médicaments étant souvent sujets à discussion et la classification pharmacologique étant controversée - il n'en reste pas moins que les idées de BURGI sont judicieuses, souvent confirmées par l'expérience, en tous cas propres à susciter des travaux intéressants. - Il est probable qu'elles sont à la base des thérapeutiques associées que LOEPER (63) étudiait, dès 1942, sous le nom d'Auxothérapie.

Voici quelques exemples d'association médicamenteuses étudiées expérimentalement, et où une potentialisation a été nettement mise en évidence.

I - La morphine ralentit le transit gastrique et intestinal chez le chien et la codéine ne le modifie pas. Si, dix heures après l'ingestion de viande, on dose l'azote du contenu stomacal, on trouve qu'après l'administration de morphine il correspond à 28 p. 100 de l'azote ingéré, alors qu'après celle de codéine, il correspond à 2 p. 100; si ces deux agents ont été associés, 58 p. 100 de l'azote ingéré se retrouve dans l'estomac. Il est d'ailleurs reconnu que dans les préparations à base d'opium, la morphine voit son action renforcée par la narcotine

qui, prise seule, n'est absolument pas sédatrice, bien au contraire.

2 - pour réaliser l'anesthésie générale, l'administration préalable de scopolamine (souvent associée à la morphine) permet de réduire considérablement la dose d'éther ou de chloroforme que doit inhaler le malade. -

3 - Certaines actions de l'adrénaline sont renforcées par la cocaïne; ainsi en est-il de l'hypertension adrénalinique. La cocaïne n'a cependant pas par elle même d'action sur la pression sanguine. -

Ainsi l'injection de 0,1 mg. d'adrénaline chez le chat augmente la pression artérielle de 56 mm. de mercure pendant 154 minutes; si cette injection avait été précédée par l'administration de cocaïne, l'hypertension eut atteint 90 mm. de mercure pendant 300 minutes. - L'hypertension s'est donc accrue de 60 p. 100 et sa durée a doublé (24).

4 - L'exemple suivant montre aussi des synergies dans l'intensité et dans la durée des actions médicamenteuses : si à des lapins présentant un accès de fièvre à la suite d'une injection de levure de bière, on administre de la phénacétine, la température baisse rapidement mais au bout de deux à trois heures, elle est revenue à sa valeur primitive; une injection d'atophan au contraire amène une chute lente et prolongée de la température; les deux injections faites simultanément conjuguent leurs effets, la chute de température est rapide, prolongée, plus intense qu'avec chacun des médicaments employé seul.

5 - Il peut arriver aussi que la synergie se traduise par une augmentation de la durée et non pas de l'intensité de l'action; ainsi lorsqu'on injecte du sulfate de potassium en même temps que de la novocaïne (procaine), la dose nécessaire pour obtenir l'anesthésie du nerf sciatique de la grenouille est inchangée, mais le temps de latence est fortement abrégé (31).

6 - Si, avec un diurétique mercuriel, on injecte un sel acidogène, la diurèse est fortement accrue. GOODMAN et GILMAN (29) rapportent les chiffres suivants, moyennes obtenues sur quatre chiens : l'injection d'une solution de chlorure d'ammonium produit une diurèse de 100 cm^3 , l'injection de salyrgan, une diurèse de 200 cm^3 , avec les deux injections faites simultanément la diurèse est de 500 cm^3 .

C'est la recherche de synergies à base de sulfamides qui a fait l'objet de ce travail, aussi, allons nous maintenant nous étendre quelque peu sur les principales associations connues, à base de ces médicaments; nous rappellerons tout d'abord quelques notions sur le mode d'action des sulfamides. -

L'action des sulfamides est avant tout une action bactériostatique. Les modalités de cette action ne sont pas nettement établies, "pour expliquer dans son intimité l'action bactériostatique des sulfamides, on en est encore réduit aux hypothèses." (HAZARD, loc. cit.). Les sulfamides n'agissent pas directement sur les microbes, ni sur leurs toxines, ils n'augmentent pas la phagocytose et ne font pas apparaître d'anticorps. La théorie qui rend le mieux compte de l'action des sulfamides est celle de WOODS (127-128) et de FILDES (17) : les sulfamides entrent en compétition avec l'acide para-amino-benzoïque (P.A.B.) pour se fixer sur un enzyme; si P.A.B. l'emporte, les phénomènes vitaux se déroulent normalement, acide folique, purines, thymine et méthionine sont synthétisés à un rythme normal; au contraire, si le sulfamide se fixe sur l'enzyme certaines réactions sont arrêtées, la morphologie de la cellule est modifiée (30) et la division cellulaire n'a plus lieu.

Pour d'autres savants certains enzymes seraient inhibés par les sulfamides, par exemple la catalase ce qui provoquerait dans ce cas l'accumulation d'eau oxygénée, toxique (74 - 92 - 107).

Pour d'autres auteurs, le sulfamide n'agirait qu'après oxydation (ce qui expliquerait l'existence d'une phase de latence) (7 - 20 - 49), pour d'autres encore la forme active serait la forme ionisée du sulfamide mais seule la molécule non ionisée pénétrerait dans la cellule (I2 - I9 - I02), de sorte que, à priori, les sulfamides les plus actifs seraient ceux qui sont dissociés à 50 pour 100 au pH intracellulaire. La pénétration dans la cellule dépend en particulier de la solubilité du sulfamide, qui peut être augmentée par addition de certains corps tels que l'urée. (62).

Quel que soit le mécanisme de l'action des sulfamides, l'effet principal de ces médicaments réside dans leur action antibactérienne qui, suivant la concentration, peut être une simple inhibition (le taux de multiplication diminue) ou une bactériostase nette (pas de multiplication) ou une action bactéricide (le nombre des germes vivants diminue et peut même s'annuler). -

Les expérimentateurs se bornent généralement à rechercher la concentration en sulfamide qui amène une bactériostase en 48 heures, ou, plus simplement, la plus faible dose de sulfamide qui empêche la prolifération visible d'un germe déterminé, pendant 48 heures, dans un volume donné d'un milieu de culture approprié - Là, plus qu'ailleurs en expérimentation, il est nécessaire de multiplier les expériences et d'en comparer les résultats avec des témoins sans sulfamide - On a montré en effet, que, si on compare l'activité, vis à vis de Esch. Coli cultivé en milieu synthétique, du sulfanilamide au thiazomide, le rapport des quantités de ces deux médicaments qui permet d'obtenir 48 heures de bactériostase varie de 1 à 4, suivant les auteurs et les conditions d'expérience.

Bien entendu, les essais de synergie, faits avec les sulfamides ont toujours été réalisés avec l'idée d'applications possibles à la clinique humaine, et doivent donc être précédés d'essais in vivo. - Ceux-ci, d'après FRISK (23), concordent assez bien avec ceux obtenus in vitro; d'autres auteurs (I03 - I04 - I08 - I24) disent, au contraire, que la concordance est mauvaise.

On a pu néanmoins écrire (125) : ce qui est actif in vitro l'est in vivo, sauf si la toxicité empêche l'emploi de doses suffisantes, ou si (chez les êtres supérieurs) l'élimination est trop rapide, ou si l'infection localisée est hors de l'atteinte du sulfamide.

Parmi les composés donnant des effets synergiques avec ceux des sulfamides, deux surtout ont paru remarquables : l'azochloramide : (N-N dichloroazodicarbonamide) et le pyridium, (chlorhydrate de phénylazodiaminopyridine). De très petites quantités d'azochloramide ajoutées au milieu contenant des sulfamides potentialisent leur action vis à vis de *Staphylococcus aureus*, le *Pneumococcus*, l'*Escherichia Coli* (NETER 76 - 77, SCHMELKES et WYSS 101, GOLDBERGER 27). Ces auteurs ont pensé que l'azochloramide inactivait P.A.B., ce qui corroborait l'idée de Mac LEOD (65), selon laquelle les souches sulfamido résistantes élaborent davantage d'antisulfamide (P.A.B.). Cette opinion n'est pas unanimement admise, en particulier par KOHN (55-56); en tous cas, in vivo, l'association sulfamide azochloramide n'a pas paru présenter d'avantages nets -

D'après NETER et LOOMIS (78-79) le pyridium potentialise les effets du sulfamide sur *Esch. Coli* - Les purines, la guanine en particulier, sont synergiques des sulfamides (90), bien que, dans d'autres conditions, un certain antagonisme puisse être mis en évidence (33 - 34 - 55 - 56 - 59 - 106 - 110).

L'éthionine et la nor-leucine potentialisent les effets des sulfamides, mais seulement en l'absence de méthionine ou de peptone (33). L'urée et ses dérivés, les acides nucléiques, l'acridine, le bleu de méthylène, le chlorure mercurique ont donné des résultats variables quand on les associe aux sulfamides. Les plus marquants de ces résultats seront signalés à propos de chacun des corps étudiés.

Nous venons de mentionner que GOLDBERGER (27) avait indiqué les bons effets de l'association de l'azochloramide (à 0,002 g.p.100) au sulfanilamide (à 0,01 g.p.100) sur l'inhibition de croissance du *Staphylocoque*; ce même auteur, a essayé, sans beaucoup approfondir ses expériences, les effets de

l'association d'un sulfamide à d'autres agents : la dichloramine T, l'iode (solution de Lugol), le thymol iodé, l'iodoforme, le mercurochrome et autres antiseptiques mercuriels, le phénol, l'hétyl-résorcine, l'hydroquinone, la 8 hydroxyquinoléine, le permanganate de potassium.- L'emploi de l'azochloramide, de l'iode (solution de Lugol) et, d'une façon générale, des oxydants, a apporté d'appréciables retards à la prolifération bactérienne.

GOLDBERGER pense que les oxydants potentialisent les sulfamides parce qu'ils oxyderaient P.A.B. existant dans les cellules bactériennes et donc l'inactiveraient, le rendraient impropre à entrer en compétition avec le sulfamide vis à vis d'un enzyme.

Notons que l'association des sulfamides entre eux se justifie in vivo, parce que cela permet de réduire les doses de chaque sulfamide et donc d'en additionner les avantages en en divisant les inconvénients. In vitro aussi, l'association des sulfamides se traduit parfois par une nette synergie - Pour GOLDBERGER (27) des concentrations en sulfanilamide et en thiazonide qui, employées seules, eussent amené une bactériostase d'une vingtaine d'heures, ne permettant le développement bactérien qu'au bout de 40 heures, lorsqu'elles sont employées simultanément.

L'association sulfamide-pénicilline a naturellement été étudiée in vitro (5 - 94 - 95 - 121) et in vivo (4 - 10 - 39) utilisée en clinique (115). L'association avec la streptomycine (6 - 35 - 44) a été également étudiée - Dans l'un et l'autre cas, il s'agit de synergie qui peut être plus ou moins renforcatrice - Pourtant KNAPP (52) indique que, s'il y a synergie vis à vis du Bacille dysentérique entre sulfamide et pénicilline, la synergie n'existe pas vis à vis des bactéries du groupe Coli-typhique - CHARNLEY (10) rappelle que, pour BIGGER et TODD, la pénicilline est plus active, in vitro, quand les microorganismes sont en voie de multiplication; l'association avec un bactériostatique pourrait donc, parce qu'elle empêche

la multiplication, diminuer l'efficacité de la pénicilline; en fait, pour CHARNLEY, l'association thiazonile-pénicilline n'est pas plus active que le sulfamide employé seul -

Ajoutons que POUCHOL (87) a montré les effets généralement synergiques et parfois antagonistes du phénol et de quelques di-et polyphénols avec les sulfamides - Ses résultats seront résumés p. 10).

CHAPITRE IITECHNIQUES SUIVIES DANS NOS RECHERCHES
=====

Nous exposerons successivement dans ce chapitre ce qui concerne : A) le milieu de culture, B) le microorganisme choisi, C) l'ensemencement, D) le matériel utilisé, E) la préparation des solutions, F) la mesure du développement, G) le choix du sulfamide, H) le choix de l'agent associé, I) la technique d'un essai. Pour terminer, nous indiquerons la technique des expériences in vivo auxquelles nous avons pu procéder.

A) CHOIX DU MILIEU DE CULTURE

A la suite des travaux de POUCHOL et, pour les mêmes raisons, nous avons utilisé le milieu de TULASNE et WURTZ, qui lui avait été conseillé par le Professeur MARCHAL; comme POUCHOL, nous avons substitué le sulfate d'ammonium à l'urée, puisque ce corps est susceptible de modifier l'activité des sulfamides (voir page 66)

Le milieu que nous avons adopté avait la composition suivante :

$\text{Po}^4 \text{ KH}_2$	1 g
CIK	0,50 g
$\text{So}^4 \text{ Mg}$	0,50 g
$\text{So}^4 (\text{NH}^+)^2$	4,73 g
Glucose	10 g
Eau distillée	q.s.p. 1.000 cm ³

Il était amené à pH 7,2, à l'aide d'une solution saturée de phosphate disodique.

B) CHOIX DU MICROORGANISME

A la suite de nombreux auteurs, nous avons tout d'abord utilisé, dans nos essais, Escherichia Coli (Colibacille), isolé d'une urine, fortement indologène (1) -

Notre choix s'est porté pour de nombreuses raisons sur cette bactérie, ne prenant pas le Gram : Esch. Coli est en

(1) Cette souche, étiquetée J 3 dans la collection du Laboratoire de Microbiologie, nous a été aimablement fournie par Mr le Professeur MARCHAL; nous l'en remercions bien vivement.

effet un germe peu virulent, peu pathogène pour l'expérimentateur, peu exigeant au point de vue de sa culture; il est aérobic et anaérobic, asporulé, il présente l'avantage de ne pas former de voile dans le milieu utilisé et il végète dans la totalité du liquide de culture.-

A la suite de tentatives d'essais in vivo, effectuées sur la souris, avec Esch. Coli, nous avons pu constater le peu de virulence de cette souche chez l'animal en expérience; c'est la raison pour laquelle, dans tous nos essais, in vivo et dans certains essais in vitro, nous avons utilisé une souche de Salmonella typhi murium(I). Ce bacille, qui ne prend pas le Gram, est un aérobic facultatif, mobile, très virulent pour la souris, il l'est très peu pour l'homme.

Salmonella typhi murium est aussi facilement cultivable que Esch. Coli sur milieux synthétiques - Comme ce dernier, il pousse dans la totalité du liquide et ne forme pas de voile à la surface du milieu de culture.

Enfin nous avons songé à utiliser Staphylococcus aureus; cette bactérie, à réaction de Gram positive, pousse très difficilement sur le milieu synthétique que nous avons employé; KNIGHT (53-54) a déterminé les exigences du Staphylocoque; ce microorganisme peut faire la synthèse de divers corps, en particulier celle de la riboflavine et parfois celle de la biotine (86); mais certaines vitamines lui sont absolument indispensables et doivent lui être apportées par le milieu de culture : c'est le cas de l'acide nicotinique et de la thiamine (ou tout au moins de l'association des deux noyaux pyrimidine et thiazol).-

Nous avons renoncé à utiliser Staphylococcus aureus, désirant employer le même milieu de culture dans tous nos essais.-

C) ENSEMENCEMENT

Préparation de la suspension microbienne

A partir de la souche microbienne, nous avons fait trois passages successifs de 24 heures sur gélose inclinée. Le troisième passage une fois terminé, nous avons préparé une suspen-

(1) Voir note page précédente.-

sion assez riche, et, par la méthode de KOCH, nous avons isolé des colonies sur boîte de PÉTRI, en opérant sur deux ou trois boîtes pour plus de sûreté - Partant d'une colonie, nous faisons un ensemencement sur milieu synthétique, de façon à obtenir une suspension-mère qui, après dix-huit heures de séjour à 37°, servait à ensemencer les tubes de milieu -

La souche bactérienne était conservée sur tube de gélose inclinée, à la température du laboratoire et était repiquée toutes les trois semaines environ.

D) MATERIEL UTILISE

La verrerie utilisée était lavée au mélange sulfochromique, soigneusement rincée à l'eau ordinaire, puis à l'eau distillée, enfin stérilisée soit au four PASTEUR (pipettes PASTEUR, boîtes de PETRI, fioles d'ERLENMEYER, tubes à essais, etc..) soit à l'autoclave (pipettes graduées).-

E) PREPARATION DES SOLUTIONS DE SULFAMIDE OU D'AUTRES AGENTS

Nous opérons la dissolution de ces différents corps par agitation dans la quantité nécessaire d'eau distillée stérile, parfois en présence de carbonate de sodium ou de soude, placés dans des récipients également stériles - Ces solutions étaient préparées immédiatement avant chaque essai (sauf en ce qui concerne celle du sulfamide qui est de bonne conservation) afin d'éviter toute altération, et étaient filtrées sur bougies de porcelaine.-

F) MESURE DU DEVELOPPEMENT MICROBIEN

Beaucoup de méthodes ont été indiquées pour apprécier le développement microbien - Elles ont été passées en revue par E.DESOROUX (14):

- numération directe ou indirecte à l'aide du microscope.
- pesée ou mesure du volume des corps microbiens après centrifugation.
- dosage du carbone ou dosage de l'azote.
- respirométrie à l'aide de l'appareil de WARBURG.
- évaluation du trouble apporté aux milieux liquides par la masse microbienne, sont les principales méthodes, celles

dont l'emploi est le plus fréquent.

Nous avons choisi une méthode néphélométrique, malgré ses imperfections qui ont été signalées notamment par Ph. LASSEUR et A. DUPAIX (60), en raison de sa commodité et parce que ses résultats semblent concorder à peu près avec ceux des autres méthodes (HOFFMAN - OSTENHOF 42-43).

Toutes nos mesures ont été effectuées au spectrophotomètre de COLEMAN, ce qui nous a permis :

1° de faire les mesures sur les tubes de culture eux-mêmes : tous ces tubes doivent être de dimensions aussi semblables que possible et être formés de verre de coloration et d'épaisseur identiques.

Ainsi les lectures peuvent être faites en fonction du temps sur une même culture, sans avoir à faire de prélèvement, ni de transvasements; l'opération est brève, de sorte que le tube ne quitte l'étuve que fort peu de temps.

2° d'opérer avec la longueur d'onde appropriée, c'est-à-dire celle pour laquelle une faible variation apparente d'opacité donne des densités optiques aussi différentes que possible; nous avons choisi uniformément la longueur d'onde 610 mμ

3° de lire non pas le pourcentage de transmission : (rapport de l'intensité de la lumière transmise à celle de la lumière incidente) ou la transmittance : (rapport du faisceau lumineux qui sort du tube coloré à la densité du faisceau qui sort du même tube rempli d'eau) mais, directement, la densité optique qui est le cologarithme de la transmittance.

$$\text{densité optique} = - \log T$$

Pour rendre la lecture des résultats plus facile, nous avons, à la suite de nombreux auteurs, multiplié par 100 tous nos chiffres de densité optique - Ainsi, une transmittance de 50 p.100 correspond à une densité optique 0.30, que nous écrirons dorénavant 30 - Les densités optiques sont proportionnelles aux concentrations ou aux opacités, lorsque la loi de BEER-LAMBERT est applicable à la suspension, ce qui était le cas dans nos expériences.

G) CHOIX DU SULFAMIDE

Le sulfamide, antérieurement utilisé au laboratoire dans des essais d'association avec les corps à fonction phénol, était le para-amino-benzène-sulfamide ou II62 F ou Sertoplix ou Sulfanilamide - C'est en effet le plus simple de tous, le plus anciennement utilisé, et surtout le plus soluble dans l'eau, ce qui permet d'obtenir des solutions aqueuses relativement concentrées et d'un pH voisin de 7.

Mais, au cours d'essais que nous avons effectués pour nous rendre compte de l'activité bactériostatique des différents sulfamides, sur *Salmonella typhi murium*, nous avons constaté que le sulfanilamide était un des moins actifs parmi ces corps - Le tableau suivant reproduit nos résultats. Les chiffres figurant dans ce tableau, sont les moyennes des densités optiques (x 100) de deux tubes de culture de *S. typhi murium*, additionnés de sulfamides aux concentrations :

0,008 g.p.100 (colonnes n° 1)

0,012 g.p.100 (colonnes n° 2)

0,016 g.p.100 (colonnes n° 3)

0,02 g.p.100 (colonnes n° 4)

Té- moins	Sulfanilamide				Thiazonide				Dagénan				Ganidan				Fontamide			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
19	7	4	3	4	0	0	2	1	3	0	0	1	4	2	1	0	2	0	1	0
21	15	14	7	6	0	0	2	1	3	0	0	1	13	12	10	0	2	0	1	0
26	20	20	17	18	1	0	2	1	5	1	1	2	17	17	17	7	7	6	6	8

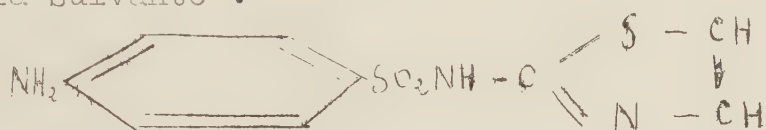
Tableau n° I

C'est le thiazonide qui, après 48 heures de séjour à 37° des tubes ensemencés, s'est montré le plus actif sur *S. typhi murium*.

KLINFELTER (51) a montré que, tant in vitro qu'in vivo la sulfadiazine (sulfapyrimidine ou p. amino benzène sulfonamido

pyrimidine) est plus active que le sulfathiazol (ou thiazomide) ou vis-à-vis d'Esch. Coli - C'est, d'après cet auteur, le sulfamide le plus actif contre les infections colibacillaires chez la souris - Mais, la sulfadiazine est très peu soluble, son sel de sodium est très soluble, certes, mais la solution ainsi obtenue possède un pH égal à 9,9, trop alcalin dans nos conditions expérimentales. Le thiazomide est 6 fois plus soluble à 25° que la sulfadiazine et, les concentrations utilisées étant très faibles, la solubilisation des doses nécessaires était relativement facile sans élévation notable du p H.

Le thiazomide dérive du para amino benzène sulfamide par substitution du noyau thiazol à un atome d'hydrogène de la fonction $\text{SO}_2 \text{NH}_2$ - C'est le Sulfathiazol ou 2090 R.P; sa formule est la suivante :



Il se présente sous forme d'une poudre blanche, cristalline, inodore et insipide, de solubilité égale à 0,6 g.p.1000 à 20° et à 0,9 g.p.100 à 37°.-

Concentrations utilisées.

Les concentrations étaient variables, puisqu'il s'agissait de trouver une dose de sulfamide amenant une inhibition légère ou même nulle, afin de constater si l'association avec un autre médicament produisait une synergie importante.

Nous avons constaté, comme autrefois ARLOING (2) qu'une même concentration en sulfamide, utilisée dans des expériences effectuées à quelques jours d'intervalle, ne provoquait pas la même inhibition - Une même concentration de 0,01 g.p. 100 par exemple pouvait amener une inhibition, tantôt forte et tantôt faible - Comme c'est l'inhibition faible qui était souhaitée, si cette concentration de 0,01 g.p.100 s'avérait trop active dans les conditions de l'expérience, nous employions alors une concentration de 0,005 g.p.100.

H) CHOIX DE L'AGENT A ASSOCIER AU SULFAMIDE

L'association d'un phénol à un sulfamide, étudiée au laboratoire, s'était montrée heureuse, du moins dans les conditions d'expérimentation in vitro qui avaient été choisies - L'action des diphénols et des triphénols (87) essayés avait été également favorable dans l'ensemble; aussi nos premières expériences d'association furent-elles réalisées avec des corps possédant une ou plusieurs fonctions phénol - Ces corps avaient au moins deux raisons de s'imposer à nous :

1°) Ce sont des antiseptiques par eux-mêmes dont le mode d'action semble différent de celui des sulfamides (83 - 84 - 87) Ce mode d'action a souvent été rapporté à la dénaturation des protéides. HOTCHKISS (43) le précise en indiquant que les phénols produisent de la cytolyse. Ainsi que GALE (25) il attribue cette action à la tensioactivité des phénols. Ces phénomènes cytolytiques semblent indépendants des enzymes, ils sont irréversibles, car l'agent tensioactif est absorbé par la cellule (15)

2°) Ce sont des réducteurs, facilement oxydables, en donnant lieu, aux r H biologiques, à des équilibres propres à catalyser des réactions chimiques qui pourraient - ou non - faciliter le développement microbien en présence de sulfamide -

En dehors des PHENOLS déjà étudiés au laboratoire (phénol-hydroquinone-résorcine-pyrogallol-phloroglucine) nous avons étudié l'association, avec le sulfamide, des corps suivants :

THYMOL: dont l'unique fonction phénol n'est associée qu'à des radicaux hydrocarbonés -

ACIDE SALICYLIQUE: dont l'unique fonction phénol est associée à une fonction acide en ortho qui modifie beaucoup les propriétés : oxydabilité moindre, plus faible affinité pour les protéides - Cependant, l'acide salicylique reste un bon antiseptique. Nous nous sommes demandé dans quelle mesure les effets de l'acide salicylique devaient être effectivement rapportés à la fonction phénol, et c'est pourquoi nous avons aussi essayé l'ACIDE BENZOIQUE où la fonction phénol est absente et l'ACIDE ACETYL-SALICYLIQUE où elle est bloquée -

ACIDE GENTISIQUE : ce produit d'oxydation in vivo de l'acide salicylique vient de conquérir une place importante dans le traitement du rhumatisme articulaire aigu; son action, en association avec le sulfamide, méritait d'être étudiée, parallèlement à celle de l'acide salicylique -

ACIDE PARA - AMINO - SALICYLIQUE (P.A.S.) : l'action de P.A.S. méritait d'autant plus d'être étudiée, que, en dehors de son action spécifique sur le bacille de KOCH, l'acide para-amino-salicylique a une analogie de structure avec l'acide para-amino-benzoïque, l'anti-sulfamide type -

TANIN : bien qu'il ne s'agisse pas d'un corps chimiquement défini, ce médicament, à nombreuses fonctions phénols, a déjà été associé au sulfamide en thérapeutique externe, une étude de cette association in vitro était donc intéressante à entreprendre -

A côté des corps précédents, en équilibre d'oxydoréduction dans les conditions biologiques, nous avons essayé l'action de corps franchement réducteurs ou fortement oxydants.

Comme REDUCTEURS, nous avons employé L'ARSENITE DE SODIUM (qui, d'ailleurs, possède une action inhibitrice sur de nombreux enzymes, ce qui rendait son essai d'autant plus intéressant) et le METHYLENE SULFOXYLATE de SODIUM qui a été préconisé contre les intoxications mercurielles -

Comme OXYDANTS, nous avons tout d'abord essayé le CHLORATE de POTASSIUM : les résultats, extrêmement nets obtenus, nous ont conduit à tenter des essais in vivo - Ils nous ont aussi amené à essayer d'autres oxydants :

IODATE de POTASSIUM - CHLORAMINE - NITRATE - ARSENIATE - PERMANGANATE, et aussi des persels tels que PERSULFATE et PERBORATE -

Des COLORANTS ont été aussi étudiés, ces grosses molécules organiques ayant une action antiseptique fort marquée par elle-même - Nous avons employé le BLEU de METHYLENE et la GONACRINE -

Des VITAMINES ont également fait l'objet de quelques essais - A vrai dire, nous n'avions pas beaucoup l'espoir qu'elles seraient synergiques des sulfamides; on pouvait penser que, -coferments-, leur présence pourrait surtout permettre au micro-organisme de suppléer aux enzymes inhibés par les sulfamides, et c'est plutôt à des phénomènes de levée d'inhibition que nous nous attentions.- Il est vrai que Esch. Coli est susceptible de synthétiser les molécules de vitamines qui lui sont nécessaires, et, si cette synthèse est assez abondante, on comprend que l'addition de vitamines au milieu n'ait pas modifié le développement bactérien - Nous avons étudié les associations du thiazomide avec l'ACIDE ASCORBIQUE (vitamine C), la THIAMINE (vitamine B₁), la RIBOFLAVINE (vitamine B₂) -

Enfin, dans un dernier chapitre, intitulé DIVERS, nous avons groupé quelques associations qu'il nous avait paru intéressant de tenter :

Nous nous sommes adressés : - à un très puissant toxique cellulaire, le CHLORURE MERCURIQUE; son point d'attaque probable est si différent de celui prêté aux sulfamides qu'on pouvait espérer une action synergique nette.

- à l'UREE, dont l'action a été discutée (synergique des sulfamides selon les uns, antisulfamide selon les autres),

- à la SULFO-UREE (thiourée) dont l'action, croyons-nous, n'avait jamais encore été essayée en association avec les sulfamides, et enfin,

- à l'ACIDE NUCLEIQUE, qui, comme cela était à prévoir, n'a montré aucun effet net.-

1) TECHNIQUE D'UN ESSAI réalisé in vitro

Nous utilisons des tubes en verre pyrex, calibrés, de 18 mm de diamètre, qui contenaient 10 cm³ du milieu synthétique stérile, dont nous avons donné la composition-

Chaque tube étaitensemencé, selon la technique bactériologique, avec 0 cm³, 2 d'une suspension bactérienne âgée de 20 heures (densité optique 20) - Nous avons remarqué en effet que l'addition d'un nombre déterminé de gouttes de cette suspension,

prélevée à l'aide d'une pipette PASTEUR ne donnait pas toujours un développement uniforme de la culture - Cela tenait au fait que le calibrage de ces pipettes variait suivant les cas (88) nous avons alors mesuré notre inoculum à l'aide de pipettes graduées au centième de centimètre cube.

Chaque série d'expériences comportait toujours trois témoins :

- l'un était constitué par Esch. Coli ensemencé sur milieu synthétique pur; il était le témoin de la vitalité du germe,

- le deuxième contenait du milieu additionné de sulfamide avant ensemencement; il nous permettait de fixer l'action bactériostatique de ce corps dans les conditions de l'expérience,

- dans le troisième, le sulfamide était remplacé par l'agent choisi,

- l'expérience proprement dite portait sur l'association du sulfamide avec l'agent choisi, employés aux mêmes concentrations que dans les deux témoins précédents,

Quand ces substances étaient introduites, nous placions les tubes à l'étuve à 37° non sans les avoir homogénéisés par agitation,

Nous effectuions les lectures au spectrophomètre de COLEMAN, (voir page 13) à des temps variables mais déterminés,

Nous avons naturellement fait, dans chaque cas, plusieurs séries d'expériences; les chiffres que nous publions dans ce travail sont des moyennes; dans le cas où plusieurs essais, faits dans des conditions un peu différentes, nous ont donné des résultats semblables, nous ne publions qu'une série d'expériences.

J) ESSAIS réalisés in vivo.-

Lorsque les résultats des expériences effectuées in vitro nous avaient paru satisfaisants, nous tentions de les transposer in vivo.- Ce fut le cas pour l'association aux sulfamides de l'acide salicylique, de l'acide acétylsalicylique et du chlorate de potassium.

Nos essais sur l'animal ont été peu nombreux, en raison de la difficulté de conserver les souris au laboratoire, qui, à l'époque de nos expériences, était encore en période d'installation. De plus, il nous aurait fallu un nombre considérable d'animaux à cause de la multiplicité de déterminations qu'une expérience conduite avec rigueur, eut exigées.

Des essais préalables nous ont montré que, dans nos expériences notre souche de Esch. Coli n'était pas assez rapidement mortelle pour la souris, aussi nous sommes nous adressés à Salmonella typhi murium, plus connue sous le nom de Bacille d'Aertrycke, très virulent pour la souris et faiblement pour l'homme.

Malgré la solubilité relativement importante du Sulfanilamide, nous avons préféré utiliser le thiazomide, dont l'action anti-infectieuse nous a paru plus forte, pour effectuer nos essais in vivo.

Avant les essais définitifs, nous nous assurons que les produits injectés n'étaient pas toxiques par eux-mêmes pour les animaux en expérience.

TECHNIQUE.

Nous utilisons des souris blanches, d'un poids minimum de 20 Gr. mâles de préférence, ou, en tous cas, de même sexe pour un essai déterminé.

Nous procédions tout d'abord à l'inoculation par voie intrapéritonale, de la suspension microbienne, puis, aussitôt après, nous injectons successivement les solutions de sulfamide et de l'agent que nous désirions lui associer. Dans tous nos essais, nous n'avons fait qu'une seule injection de chacun des deux médicaments, en utilisant, chaque fois, un volume très réduit de leurs solutions.

Nous avons d'abord utilisé 0 cm³20 ou 0 cm³25 d'une culture de 24 Heures de S. typhi murium sur milieu synthétique (densité optique 20).- Cette dose provoquait une mort trop rapide chez les animaux infectés, aussi avons-nous employé 0cm³25 ou 0 cm³35 d'une dilution au tiers, dans le sérum physiologique,

de cette même culture. Les animaux mourraient au bout d'une vingtaine d'heures environ. Nous avons vérifié que la mort des souris en expérience n'était pas due à l'injection du milieu de culture. Celui-ci avait une inocuité totale : dans chaque série d'expériences, nous faisons toujours plusieurs témoins qui ne recevaient que du liquide dispersif. Ces témoins ont toujours survécu à l'inoculation de ce liquide.

Nous avons traité les souris, quelques minutes après l'injection de *S. typhi murium* par voie intrapéritonale, par différentes doses de thiazomide, afin de déterminer la quantité de ce médicament qui ne guérisse pas l'infection, mais qui, cependant en retarde le cours ou même la guérisse parfois. Les résultats figurent dans le tableau suivant :

TABLEAU N° 2

e d'animaux	:Cm ³ de suspen- sion de <i>S. typhi</i> murium	:Thiazomide injecté en mg.	:Nombre d'animaux morts en			
			24 H.	48 H.	au total	
3	: 0.2	: 1.5	: I	: 2	: 3	
3	: 0.2	: 2	: I	: 2	: 3	
3	: 0.2	: 2.5	: I	: -	: 1	

Dans les essais définitifs, nous avons opéré de la façon suivante : un certain nombre de souris étaient inoculées avec 0 cm³₂₅ ou 0 cm³₃₅ de suspension diluée de *S. typhi murium*. Certaines n'étaient pas traitées, d'autres étaient traitées par une quantité insuffisante de thiazomide, d'autres par du salicylate de sodium, de l'aspirine ou du chlorate de potassium, d'autres enfin à la fois avec du thiazomide et l'agent choisi, aux doses qui seront indiquées à propos de chacun des corps dont l'étude in vivo a été entreprise.

CHAPITRE III

ASSOCIATION DE CORPS A FONCTION PHENOL AVEC LES SULFAMIDES

---:---:---:---:---

Comme nous l'avons dit dans le chapitre II (Page I6), l'étude des phénols s'était imposée parce que ces médicaments, antiseptiques par eux-mêmes et formant un système oxydoréducteur aux r H biologiques, avaient ainsi deux raisons de modifier l'action des sulfamides et, éventuellement, de la renforcer -

Puisque le pouvoir antibactérien des phénols a été mis en relation avec leur possibilité de s'oxyder en quinones de façon reversible, on pouvait alors se demander si les quinones elles-mêmes seraient actives; on sait d'ailleurs que nombre d'antibiotiques naturels possèdent une formule quinonique (93). L'équilibre entre la forme phénol et la forme quinone pouvant être long à atteindre, l'effet propre des quinones pourrait se faire sentir et il y aurait lieu de le rechercher - MASSI (73) a montré, in vitro, que la quinone (benzoquinone) et la quinhydrone avaient un pouvoir bactériostatique net, bien qu'inférieur à celui de la Pénicilline; la toxicité propre de ces quinones rendait leur emploi impossible en médecine - Un grand nombre de quinones appartenant à des types chimiques très divers a été étudié (4I - 42 - 67 - II8 - II9 - I20) en particulier les dérivés de la naphthoquinone présentant une activité vitaminique K - Le pouvoir antibactérien semble lié, dans une certaine mesure, à la valeur du potentiel d'oxydo-réduction correspondant à l'équilibre des formes quinone et hydroxylée; la bactériostase est maxima si ce potentiel est compris entre + 0,15 et - 0,15 V.

Nous n'avons pas étudié de synergies sulfamide-quinone et n'en n'avons pas trouvé d'exemples dans la littérature (1) - Nous nous sommes cependant demandé si le produit naturel d'oxy-

(1) Cependant NEUMANN (80) a étudié sur *Aspergillus niger* l'association : sulfamide-paraquinone et a montré que le sulfamide lève partiellement l'action toxique de la quinone.-

dation à l'air des phénols ne serait pas plus antibactérien que le phénol lui-même - Nous avons fait une solution de pyrogallol à 1 p.100 et l'avons laissée 48 heures à l'air et à la lumière; cette solution avait, soit seule, soit en association avec le sulfamide, le même pouvoir antibiotique qu'une solution fraîche de pyrogallol au même titre -

Postérieurement à ces essais, nous avons eu connaissance du travail de DALIEMAGNE et DEROUAUX (13) qui ont signalé, à propos du pyrocatechol, il est vrai, une augmentation du pouvoir bactéricide, avec le temps de contact du microbe et de l'antiseptique; ils attribuent ce phénomène à l'oxydation du diphénol en quinone. Nos conditions expérimentales ne sont pas celles des auteurs précités, ce qui peut expliquer la divergence de nos résultats.-

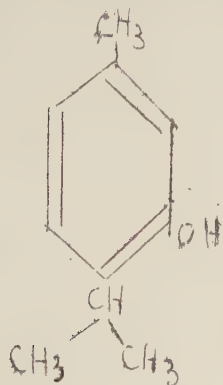
L'association des sulfamides et des phénols a déjà été étudiée - Elle paraissait devoir être intéressante, puisqu'elle permettait d'associer deux substances s'opposant au développement bactérien par des mécanismes différents -

Tandis que MARMORI (69) ne trouve ni influence du phénol sur l'action du sulfamide, ni influence de P.A.B. sur le pouvoir bactéricide du phénol vis-à-vis des microorganismes, NEUMANN (80) obtient des résultats variables sur la croissance d'*Aspergillus niger* -

Les essais effectués antérieurement au Laboratoire avaient été encourageants et avaient permis de montrer que, dans des conditions définies de concentration, la synergie avec les sulfamides était réalisée avec tous les phénols essayés et que son intensité croissait dans l'ordre : Résorcine - Pyrogallol - Phloroglucine - Phénol - Hydroquinone -

Nous rapportons ici les résultats obtenus, sur la croissance de *Esch. Coli*, avec le thymol, avec l'acide salicylique et des corps chimiquement apparentés à lui, avec le tanin, ces corps étant employés seuls ou en association avec des sulfamides -

A) EFFET DU THYMOL



Le thymol ou p. isopropylmétacrésol, diffère donc du phénol par la présence de deux radicaux alcoyles; il est classiquement admis (voir en particulier ZUNZ 131) qu'une telle modification de la structure d'un phénol exalte les propriétés bactéricides et le fait vient encore d'être mis en évidence par DALLEMAGNE et DEROUAUX (13) à propos des trois pseudobutyles crésols isomères.

Le thymol est employé actuellement plus pour ses propriétés anthelminthiques que pour son pouvoir antiseptique, cependant manifeste. On a coutume de dire que le thymol est bactériostatique, d'ailleurs que le phénol, mais qu'il est moins bon germicide. Le "coefficient phénol" du thymol serait de 25 mais l'action du thymol, est, bien plus que celle du phénol, gênée par la présence de matières organiques et l'action du thymol in vivo n'est donc pas du tout superposable à celle qu'il manifeste in vitro.

Le Thymol se présente sous la forme de cristaux odorants, trop peu solubles dans l'eau pour nos besoins, mais nous les avons dissous dans la soude N/10 en quantité strictement nécessaire; nous avons vérifié que le p H du milieu ne variait pas sensiblement quand on lui incorporait un volume, toujours faible, de solution alcaline de thymol. Nous avons cherché à mettre en évidence l'importance de l'action bactériostatique dans nos conditions expérimentales. Les concentrations en thymol supérieures à 0,01 g.p.100 empêchent toute croissance de Esch. Coli dans les 24 premières heures tout au moins : 0,01 g.p.100 semble être la concentration d'activité limite : il y a parfois croissance, parfois l'inhibition reste totale. A une concentration de 0,008 g.p.100, le développement est net quoiqu'inférieur à celui du témoin (qui montre déjà une opacité de 19 à 20).

A la concentration de 0,002 g.p.100, l'action du thymol est à

peine marquée, l'opacité étant de 16 en 24 h; mais, alors que l'opacité de la culture témoin augmente souvent encore un peu après la 24ème heure, celle de la culture additionnée de thymol reste fixe.-

Les résultats de l'association du thymol au sulfanilamide sont reproduits dans le tableau n° 3 -

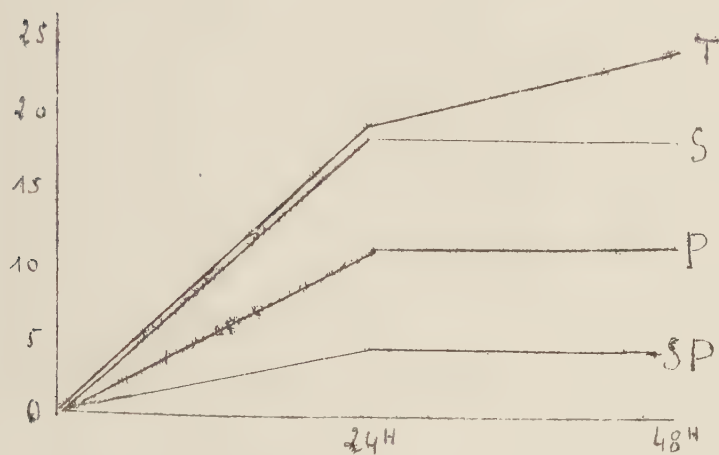
T A B L E A U N° 3

Concentration en sulfanilamide %	temps en heures	T	S	Densité optique (x 100) des tubes contenant thymol seul (P) ou associé au sulfamide(SP)	1	2	3	4	5	6	7
	24	19	-	P	16	14	14	13	13	10	9
0,004	24	19	18	SP	10	10	4	4	3	1	2
	48	24	18	SP	10	10		4		4	
0,006	24	20	8	SP			3	2	3	0	0
0,008	24	20	5	SP	0	0	0	0	0	0	0
Concentration en thymol en g%					0.002	0.004	0.005	0.006	0.007	0.008	0.01

Croissance de Esch. Coli : en milieu synthétique pur : T
 en présence de sulfanilamide : S
 en présence de thymol : P
 en présence leur association: SP

Au simple aspect de ce tableau, on voit que, dans certains cas les effets synergiques de l'association ont été nets puisque, associé à une concentration de sulfanilamide de 0,008 g.p.100, le thymol, à chacune des concentrations étudiées, a manifesté un pouvoir inhibiteur total pendant 24 heures tout au moins. Cependant la concentration 0,008 g.p.100 en sulfanilamide est déjà nettement inhibitrice. Une concentration de 0,006 g.p.100, moins nettement inhibitrice (densité optique de 8 en 24 heures)

a vu ses effets également renforcés par addition de thymol : la culture ne se développe pas ou démarre à peine en 24 Heures - Avec une concentration en sulfamide encore moindre (0,0004 g.p.100) les effets de l'addition du thymol sont moins nets, mais restent appréciables. Alors que le sulfanilamide employé seul n'exerçait pas d'action inhibitrice nette, alors que le thymol employé seul n'exerçait qu'une action inhibitrice faible, (et d'ailleurs grossièrement proportionnelle à sa concentration), l'association du thymol au sulfamide amène toujours un renforcement de l'inhibition, renforcement qui est considérable dès que la concentration en thymol est supérieure à 0,004 g.p.100. Le graphique suivant illustre un cas moyen, celui de la colonne 4 du tableau n° 3 correspondant à l'action du thymol (P) et du sulfamide (S) à 0,0004 g.p.100 en 48 heures.



GRAPHIQUE N° I

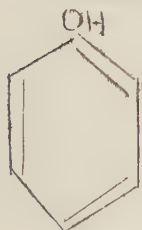
Dans tous les essais que nous avons réalisés avec emplois de concentrations en thymol et en sulfanilamide non inhibitrices, l'association des deux agents a été plus fortement inhibitrice que chacun des agents employé seul à la même dose - Il n'en est pas de même avec le phénol (voir

thèse de POUCHOL page 53), car il existe des associations sulfanilamide-phénol où l'effet inhibiteur des sulfamides a été levé par une dose convenable de phénol -

Le thymol, dans nos essais, se montra donc beaucoup plus puissant que le phénol lorsque ces agents sont employés seuls (le phénol à 0,1 g.p.100 ne retarde que d'une vingtaine d'heures le développement des cultures de Esch. Coli, tandis que le thymol agit déjà à une concentration dix fois plus faible).

La synergie thymol-sulfanilamide est plus nette que celle phénol-sulfamide et s'obtient pour des concentrations inférieures en chacun de ces deux agents.

B) EFFET DE L'ACIDE SALICYLIQUE- COMPARAISON DES EFFETS DE L'ACIDE SALICYLIQUE A CEUX DE CORPS CHIMIQUEMENT VOISINS.-



Sans doute l'acide salicylique (ou orthohydroxybenzoïque) et ses dérivés sont-ils surtout employés en médecine comme analgésiques et comme antipyrétiques. Il n'en est pas moins vrai qu'ils présentent une action antiseptique nette et d'ailleurs reconnue : on les a parfois employés en gargarismes et comme antiseptiques alimentaires. On admet que le coefficient phénol de l'acide salicylique est 1, donc égal à celui du phénol - (1)

Cette action antiseptique a pu être rapportée, suivant les auteurs et selon les concentrations utilisées à une dénaturation des protéides, à une inhibition de la fermentation du glucose, au blocage de la synthèse de l'acide pantothénique (46 - 47 - 68 - II6)

Nous avons utilisé l'acide salicylique sous forme de salicylate de sodium, car ce sel est plus soluble que l'acide et ainsi les manipulations sont facilitées - Comme nous opérons à pH 7,1 - 7,2 environ, c'est en réalité à l'acide salicylique que nous avons surtout affaire; d'ailleurs aux concentrations choisies dans nos exemples l'acide et le sel sont presque complètement dissociés et c'est sûrement l'action de l'ion salicylique que nous mettons en évidence.-

Dans nos conditions expérimentales, l'acide salicylique employé seul ne manifeste pas d'action inhibitrice nette, jusqu'à la concentration de 0,02 g.p.100; en effet, au bout de 48 heures, alors que la culture témoin présente une opacité de 21, la culture additionnée de salicylate à 0,025 g.p.100 et même cel-

(1) Le coefficient phénol n'est pas toujours mesuré dans des conditions semblables puisqu'on trouve pour l'acide salicylique des valeurs aussi différentes que 0,04 (13) et 10 (42bis)

Naturellement, si les concentrations en sulfanilamide deviennent plus faibles, l'inhibition, pour se manifester, demande des concentrations en salicylate plus importantes; ainsi avec une concentration en sulfanilamide de 0,004 g.p.100, il faut une concentration en salicylate supérieure à 0,015 g.p.100 pour que l'effet inhibiteur soit net; si la concentration en sulfanilamide n'est que de 0,002 g.p.100, l'association salicylate-sulfanilamide n'est vraiment bactériostatique que pour une concentration en salicylate supérieure à 0,025 g.p.100.-

Comme dans le cas du thymol, et contrairement à ce qui avait été signalé pour le phénol, nous n'avons pas pu mettre en évidence le phénomène de levée, par le salicylate, de l'inhibition apportée par le sulfanilamide.

Essais in vivo de l'association salicylate-thiazomide.

Nous avons effectué ces essais in vivo dans les conditions que nous avons précédemment exposées dans le chapitre 11 - Nous nous bornerons donc à indiquer les résultats obtenus -

1 - Un lot de souris est injecté avec 0,35 cm³ d'une émulsion de S. typhi murium, les 3 animaux meurent tous en moins de 7 heures.

2 - Des lots d'animaux injectés avec le thiazomide (2,5 mg.) ou le salicylate (6 mg.), employés seuls l'un et l'autre, survivent indéfiniment. Sur 3 souris injectées avec ces deux agents ensemble, l'une est morte entre 24 et 48 heures, sans doute d'une affection intercurrente car les 2 autres souris n'ont pas paru malades et, dans d'autres expériences, les animaux supportaient parfaitement cette double injection.-

3 - Des lots d'animaux inoculés avec S. typhi murium et injectés en même temps avec l'association thiazomide (2,5 mg.) et salicylate (4 et 6 mg.) ont présenté une mortalité de 4 animaux sur 6 injectés.-

4 - Dans une autre série d'expériences nous avons utilisé 0 cm³25 d'une suspension diluée de S. typhi murium, la mort arrivait en moins de 20 heures, chez tous les animaux en expérience. L'injection de thiazomide (2 mg.) aux animaux infectés

n'empêche pas que 3 animaux sur 6 meurent en 20 heures. Si, aux animaux infectés, on administre à la fois thiazomide (2 mg.) et salicylate (4 ou 6 mg.) il ne meurt qu'un seul animal sur 12 en 20 H. et 4 autres en 48 H., soit au total 5 morts sur 12.-

5 - Dans une dernière série d'expériences qui a porté sur 64 souris l'injection de 0 cm³3 d'une suspension de *S. typhi* murium amenait la mort chez tous les animaux; l'injection de thiazomide (0,5, 1 ou 1,5 mg.) faite au moment de l'injection microbienne, conjointement avec 2,4 ou 8 mg. de salicylate n'a pas empêché la mort de se produire, mais l'a souvent retardée d'un jour.

L'injection de 2 ou 2,5 mg. de thiazomide aux animaux infectés n'a empêché la mort que d'un animal sur six. L'association de 2 ou de 4 mg. de salicylate aux 2 mg. de thiazomide laisse encore une mortalité de 10 animaux sur 12; par contre l'injection de 6 mg. de salicylate et de 2 ou 2,5 mg. de thiazomide aux animaux infectés abaisse la mortalité au taux de 2 animaux sur 6.-

Si nous récapitulons nos expériences, nous voyons que sur 14 animaux infectés, traités par le thiazomide seul, 13 sont morts en 48 heures, et que sur 44 animaux traités à la fois par le thiazomide et le salicylate 34 seulement sont morts. Dans le cas où la plus forte dose de salicylate (6 mg.) a été associée à 2,5 mg. de sulfamide, la mortalité n'a été que de 1/3.-

Les résultats de nos essais in vivo, trop peu nombreux pour être probants, montrent cependant que l'association sulfamide-salicylate, à doses convenables, serait plus curative que chacun de ces médicaments, employé seul à la même dose.

Les effets de l'acide salicylique ne sont donc pas comparables en tous points à ceux du phénol. D'abord, dans nos essais l'acide salicylique s'est montré sensiblement plus actif que le phénol lorsqu'il est employé seul; ensuite la synergie entre l'acide salicylique et le sulfanilamide est bien plus marquée encore que celle existant entre phénol et sulfanilamide; en effet

l'association de concentrations en salicylate et en sulfanilamide beaucoup plus faibles (respectivement 0,04 et 0,002 g.p. 100) que celles en phénol et en sulfanilamide (respectivement 0,05 et 0,01 g.p. 100) sont suffisantes pour produire une inhibition totale, pendant 48 heures, de la croissance de Esch. Coli. Les effets du phénol, à la fois antiseptiques et synergiques de ceux du sulfanilamide, sont donc exaltés par la présence de la fonction acide en ortho qui existe dans l'acide salicylique. On pouvait se demander si la fonction acide par elle-même n'aurait pas des propriétés intéressantes et c'est pourquoi nous avons essayé l'action de l'acide benzoïque.

On pouvait aussi se demander si le blocage de la fonction phénol modifierait les propriétés antibiotiques de l'acide salicylique et c'est pourquoi nous avons essayé l'action de l'acide acétylsalicylique.

Enfin des corps intéressants en thérapeutique que l'on peut considérer comme des dérivés de l'acide salicylique (l'acide p. amino salicylique et l'acide gentisique) ont été également étudiés, et leur action a été comparée à celle de l'acide salicylique et du phénol.-

Action de l'acide benzoïque.

L'acide benzoïque est un antiseptique presque aussi actif que l'acide salicylique ou le phénol; si cependant il est moins utilisé qu'eux c'est parce que, trop peu soluble, il doit être employé en nature et il est alors irritant; les benzoates sont bien moins irritants, mais aussi moins bons antiseptiques que l'acide lui-même.-

Comme nous l'avons fait pour l'acide salicylique, nous avons utilisé le sel de sodium de l'acide benzoïque; aux dilutions auxquelles nous opérons, le p H du milieu de culture devenant légèrement alcalin (7,4) et nous avons donc affaire à l'ion benzoïque en milieu sensiblement neutre.

Nous rapportons dans le tableau N°5 deux séries d'expériences, faites à des époques différentes, qui se distinguent parce que dans l'une d'elles, le germe microbien a proliféré

normalement (densité 2I en 24 heures) tandis que dans l'autre série d'expériences le germe a été beaucoup moins prolifique (densité optique I4) et le sulfanilamide s'est montré à peine actif.

Cependant les résultats obtenus restent du même ordre en ce qui concerne l'action de l'acide benzoïque.-

T A B L E A U N° 5

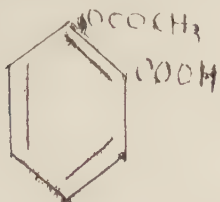
concent. sulfamide %	Temps en Heures	T	S	Densités optiques (X 100) des tubes contenant du benzoate seul (P) ou associé (SP) au sulfamide							
					1	2	3	4	5	6	7
	24	2I	-	P	-	-	I7	I7	IO	8	9
0,006	24	2I	8	SP	-	-	4	5	4	4	3
0,008	24	2I	7	SP	-	-	3	2	2	2	I
0,010	24	2I	5	SP	-	-	1	2	0	0	0
					1	2	3	4	5	6	7
	24	I4		P	IO	8	IO	9	-	-	-
0,006	24	I4	I3	SP	9	9	5	4			
0,008	24	I4	I2	SP	8	9	5	5	3	2	2
0,010	24	I4	6	SP	5	7	3	2	2	2	I
conc.en benzoate en g. %					0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07

Le benzoate, employé seul, ne devient nettement inhibiteur de la croissance de Esch. Coli que pour des concentrations supérieures à 0,05g.p.100, comme c'est le cas pour le salicylate

L'association du benzoate au sulfanilamide augmente l'effet de ce dernier mais cet effet n'est vraiment net que pour des concentrations en benzoate égales ou supérieures à 0,03g.p.100. Avec des concentrations de 0,02 et 0,01g.p.100 en benzoate, l'addition de sulfanilamide ne renforce guère l'effet inhibiteur que manifeste le benzoate employé seul à ces mêmes concentrations.-

Nous avons également fait des essais de synergie avec des concentrations en benzoate plus faibles (jusqu'à 0,002 g.p.100); ils n'ont pas été reportés sur le tableau parce qu'ils ne donnent pas de résultats intéressants : le benzoate est sans action appréciable; son association avec le sulfanilamide ne modifie pas l'intensité de l'action de ce corps -

Action de l'acide acétylsalicylique



On admet que ce corps, (connu et utilisé en thérapeutique depuis un demi-siècle sous le nom d'aspirine) agit par l'acide salicylique qu'il libère progressivement en solution in vitro et in vivo. La supériorité de l'aspirine résiderait sans doute dans ce fait qu'elle pénètre plus facilement à l'intérieur des cellules que ne le fait l'acide salicylique : ayant pénétré dans la cellule, l'aspirine s'y décompose et libère l'acide salicylique naissant, à une concentration supérieure à celle qui est réalisée par emploi direct de cet acide lui-même.

L'association sulfamide-aspirine a été tentée fréquemment en thérapeutique et FONTANA (21) a montré qu'à doses expérimentales il y avait exaltation de la toxicité du sulfamide sur les éléments figurés du sang.-

Dans nos essais, nous avons utilisé la propriété que possède l'aspirine de se dissoudre dans le carbonate de sodium; ce dernier était ajouté en quantité strictement suffisante pour amener la dissolution de l'aspirine; le p H du milieu de culture (p H = 7,4) augmentait à peine par addition de faibles volumes de cette solution alcaline d'aspirine.-

T A B L E A U N° 6

Concent. Sulfamide %	Temps en Heures	T	S	Densités optiques (x 100) des tubes contenant de l'aspirine seule (P) ou associée au sulfamide (SP)	1	2	3	4	5	6	7
	48	31	-	P	29	29	29	26	29	28	16
0,004	48	31	31	SP	27	26	29	30	26	20	15
0,006	48	31	31	SP	25	25	25	25	9	0	0
Conc. en aspirine en g. %					0,004	0,006	0,008	0,010	0,020	0,040	0,060

Il faut donc, ainsi que cela ressort des chiffres figurant au tableau N° 6, atteindre la concentration de 0,06 g.p. 100 en acide acétylsalicylique, pour qu'un effet inhibiteur net, quoique partiel, se manifeste; ainsi dans nos essais, l'aspirine se montre sensiblement aussi active que l'acide benzoïque et un peu moins que l'acide salicylique -

Associée au sulfanilamide, l'aspirine renforce l'action antibiotique de ce dernier puisqu'aucun développement bactérien ne se manifeste en 48 heures, si on associe l'aspirine à la concentration de 0,04 g.p.100 au sulfanilamide à la concentration 0,006 g.p.100. Il s'agit là d'une action synergique particulièrement nette de ces deux médicaments puisque chacun d'eux, employé seul, aux mêmes dilutions, donne en 48 H. des cultures ayant une population égale à celle du témoin (milieu pur).

L'action de l'aspirine est donc nettement synergique de celle du sulfamide mais seulement pour des concentrations bien définies; nous n'avons jamais, avec ce corps, constaté de levée de l'inhibition due au sulfanilamide, analogue à celle qui a été signalée à propos du phénol.

Essais réalisés in vivo

Nos essais ont été conduits dans les mêmes conditions que pour l'acide salicylique et la dose de 0,2 cm³ de suspension de *Salmonella typhi murium* s'est montrée mortelle en moins de 24 heures si on n'injectait pas, en temps utile un médicament approprié.

L'aspirine, seule ou associée au thiazomide, aux doses maxima employées par la suite, a été bien tolérée par tous les animaux.

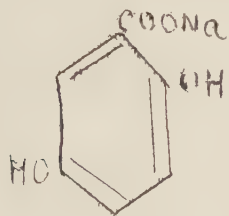
L'injection de 6 mg.d'aspirine aux animaux infectés, n'empêche pas la mort de se produire dans tous les cas.

L'injection de 2 mg.de thiazomide seul a préservé de la mort 1 des 3 animaux injectés.

Si on associe 2,4, ou 6 mg.d'aspirine aux 2 mg.de thiazomide, la mortalité diminue notablement puisque, sur 11 souris traitées, 3 seulement sont mortes, après avoir résisté plus de 2 jours.-

Notre conclusion sera la même que celle formulée pour les essais faits in vivo avec l'association sulfamide-salicylate: les expériences, trop peu nombreuses, montrent cependant que l'association sulfamide-aspirine a une action curative appréciable, bien meilleure en tous cas que celle de chacun de ces deux agents employés seuls.

Action de l'acide gentisique



Nous avons utilisé le sel de sodium de cet acide préparé par les établissements Rhône-Poulenc. L'acide gentisique ne diffère de l'acide salicylique que par la présence d'une fonction phénol supplémentaire située en para par rapport à celle existant dans l'acide salicylique. On peut donc le considérer comme une carboxyhydroquinone ou comme un acide parahydroxysalicylique.- L'association sulfanilamide-hydroquinone a été étudiée par POUCHOL (87) et s'est montrée intéressante; l'association sulfanilamide-salicylate a été traitée ci-avant il était d'autant plus naturel que nous étudions l'association sulfamide-acide gentisique, que ce dernier corps vient d'être préconisé dans le traitement du rhumatisme articulaire aigu. L'action spécifique du salicylate dans cette maladie paraît due à l'effet antihyaluronidasique qu'il possède, mais qui

pourrait être rapporté moins à l'acide salicylique lui-même qu'à l'un des produits de son catabolisme, l'acide gentisique (22 - 32 - 109).

L'étude pharmacologique de l'acide gentisique a naturellement été faite : la toxicité de ce produit est très faible, dix fois moins élevée que celle du salicylate; la toxicité sur les organismes unicellulaires est faible aussi puisqu'une solution d'acide gentisique à 1 g.p.1000 est sans action sur le staphylocoque et le colibacille, alors que l'acide salicylique, à une dilution double, est encore nettement antibactérien.

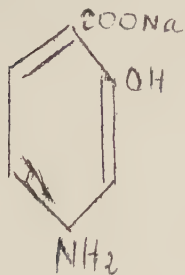
T A B L E A U N° 7

ent. : temps : : : :Densités optiques (x 100) des tubes contenant	amide : on : T : S :de l'acide gentisique seul (P) ou associé à	% :Heures: : :un sulfamide (thiazomide) (SP)									
					<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>
	48	27	-	P	24	23	23	23	20	21	22
002	48	27	I7	SP	I6	I5	I5	I3	I3	I4	I5
004	48	27	I8	SP	I7	I4	I3	I5	I3	I3	I3
.en ac.gentisique g. %					0,0001	0,0005	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1

Effectivement, dans nos expériences, le gentisate s'est montré peu actif et le développement bactérien s'approchait de celui du témoin que ce soit après 24 H, 48 H ou 96 H de culture; nous avons cependant étudié des concentrations en gentisate variant du millionième au millième cette dernière est à peine plus active que la précédente.

L'association gentisate-thiazomide s'est montrée bien peu intéressante et l'action du thiazomide n'a été renforcée qu'à peine dans les cas les plus favorables comme le montre le tableau n° 7.

Action de l'acide para aminosalicylique



C'est à la suite des travaux de BERNHEIM (1940) que LEHMANN (1946) étudia systématiquement l'action des dérivés de l'acide salicylique sur le bacille de Koch et qu'il montra l'action bactériostatique intense présentée par l'acide p.aminosalicylique (P.A.S.) sur ce germe et sur quelques germes acidoalcoolorésistants à l'exclusion des autres germes microbiens. Il aurait donc pu paraître superflu d'étudier les effets de l'association P.A.S.-sulfamide sur *Esch. Coli* si d'autres considérations ne nous avaient guidés. On sait en effet que l'acide p.aminobenzoïque (P.A.B.) est un antisulfamide énergique et que c'est même à cette action que l'activité bactériostatique des sulfamides est généralement rapportée. — On a pensé que l'action antisulfamide de P.A.B. était due à l'analogie des structures chimiques de cet acide et du noyau sulfamide : on pouvait alors se demander comment se comporterait P.A.S. dont la parenté de structure avec P.A.B. et avec les sulfamides est évidente. IVANOVICS (46) a déjà montré que, vis à vis du Bacille de Koch, une molécule de P.A.B. neutralisait trois à quatre molécules de P.A.S.

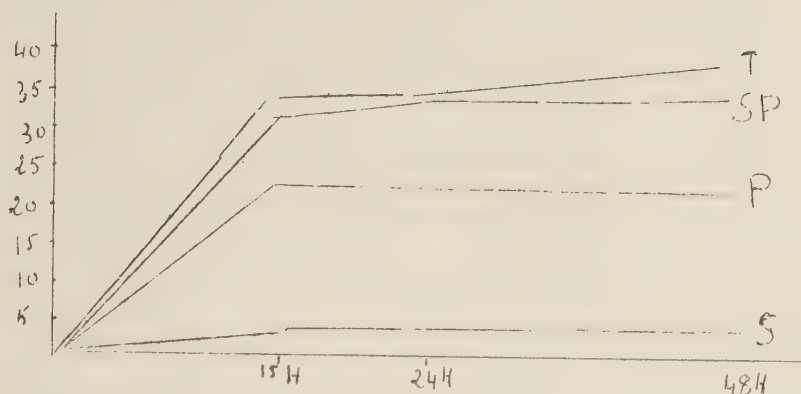
Le tableau n° 8 montre que P.A.S. employé seul n'a pas d'action bactériostatique notable sur *Esch. Coli* ou *S. typhi murium* aux concentrations comprises entre 0,003 et 0,1 g.p.100, ce qui est conforme aux données fournies par les auteurs.

T A B L E A U N° 8

Concent. Sulfamide %	temps en heures	T	S	Densités optiques (x 100) des tubes con- tenant PAS seul (P) ou associé à un sul- famide (thiazomide) (SP).							
					1	2	3	4	5	6	7
	48	25	-	P	-	22	19	18	-	21	17
sch.Coli											
,0003	48	25	17	SP	-	15	16	21	-	19	15
,0004	48	32	21	SP	-	33	30	31	-	32	29
,0008	48	40	5	SP	-	40	31	38	-	28	-
. typhi murium											
-	48	24	-	P	17	18	18	-	16	14	14
,001	48	24	16	SP	20	20	16	-	18	14	13
Conc.en P.A.S. en g. %					0,003	0,01	0,03	0,05	0,06	0,08	0,10

P.A.S. ne renforce pas l'action du thiazomide de façon nette; au contraire nous avons noté dans un cas une très belle levée d'inhibition. Cette expérience a été faite avec une concentration en thiazomide de 0,008 g.p.100; au bout de 48 H., l'action inhibitrice de ce sulfamide est encore manifeste (densité optique 5 au lieu de 40 pour le tube témoin); dans un autre essai, l'addition de P.A.S. au thiazomide à la même concentration (0,008 g.p.100) a permis à la culture de se développer aussi bien que celle du témoin (concentration comprise entre 0,005 et 0,05 g.p.100), on a des résultats à peine moins nets avec une concentration de 0,008 g.p.100; l'action antibiotique des sulfamides a donc disparu; dans nos conditions expérimentales, P.A.S. s'est montré antisulfamide ce qui le rapproche de P.A.B. (dont il ne diffère que par une fonction phénol en ortho.) (voir le graphique ci-après).

GRAPHIQUE N° 2



culture de Esch. Coli en milieu synthétique pur : T
 en présence de 0,05 g.p.100 PAS : P
 en présence de 0,008 g.p.100 thiazomide : S
 en présence de leur association : SP

C) EFFET DU TANIN

Par ses fonctions phénol, le tanin peut être rattaché au groupe d'agents placés dans ce chapitre. Il possède une action antibactérienne certaine mais rarement très marquée; cela tient, d'une part, à ce que certains enzymes l'hydrolysent en libérant de l'acide gallique inactif, et, d'autre part, à ce que le tanin se combine très facilement aux protéides et ne peut guère pénétrer à l'intérieur des cellules pour y inactiver les protéides essentiels aux processus vitaux.- BOHLMANN (5bis) a montré, notamment à l'aide du microscope électronique, que le tanin, aux concentrations supérieures à 0,01 g.p.100 provoquait un certain degré de plasmolyse (chez les Bacilles du groupe Coli-typhique). La membrane bactérienne n'était cependant pas apparemment modifiée.-

L'association sulfamide-tanin a été préconisée dès 1944 pour le traitement des brûlures (1) et cette association est entrée dans la thérapeutique, des Laboratoires l'ont utilisée mais sans penser à une synergie des actions antibactériennes :

(1) communication personnelle du Dr P. STEINER

l'action bactériostatique du sulfamide serait conjuguée à l'action "régénératrice" du tanin, pour obtenir une rapide cicatrisation des plaies et brûlures.-

Les essais que nous avons faits manquent de précision; en effet les solutions de tanin, en présence ou non de germes microbiens et d'agents chimiques, se colorent à l'air et à la lumière de façon variable. De plus les milieux se chargent progressivement de particules peu visibles, mais séparables par filtration et qui faussent les lectures au spectro-colorimètre; un peu plus tard les germes se sédimentent, ainsi que cela a été signalé par MARCHAL, THOMAS et MASSIGNON (66).

Il a donc fallu renoncer à faire des lectures opacimétriques correctes. Les résultats sont difficiles à apprécier, même grossièrement; nous avons eu l'impression que le tanin était peu bactériostatique en 24 H. vis-à-vis de Esch. Coli, à des doses comprises entre 0,1 et 0,001 g.p.100. D'ailleurs MARCHAL et ses collaborateurs (loc. cit) ont montré qu'à des concentrations déterminées le tanin ne manifestait pas d'action toxique vis-à-vis de certaines bactéries telles que Phytomonas et Bacillus prodigiosus.

L'association du tanin au thiazomide modifiait peu l'action bactériostatique de ce dernier.

X
X X

CONCLUSION DE CE CHAPITRE

Nous rappellerons tout d'abord quelques résultats obtenus par J. POUCHOL (87), concernant l'action de l'association au sulfanilamide de certains corps à fonction phénol.-

- si le phénol (hydroxybenzène) est employé à dose totalement inhibitrice, son association avec le sulfanilamide est également inhibitrice.

- si le phénol est employé à dose non inhibitrice ou partiellement inhibitrice, les effets dépendent de la concentration en sulfanilamide qui lui est associé et l'on peut voir l'inhibition sulfamidique potentialisée, ou simplement renforcée ou même levée.-

Des phénomènes analogues se retrouvent dans l'association de l'hydroquinone au sulfanilamide.- L'action de ce dernier corps a été nettement renforcée; cependant aucune levée d'inhibition ne s'est manifestée.

Les résultats obtenus avec la résorcine sont beaucoup moins nets et relativement limités.-

Au contraire la phloroglucine amène une bactériostase nettement prolongée, dans le cas où elle est associée au sulfanilamide.

Enfin le pyrogallol permet également de prolonger et d'intensifier l'effet bactériostatique du sulfanilamide.-

Ces différents corps se classent au point de vue de l'intensité de croissance de leur synergie avec les sulfamides dans l'ordre suivant : hydroquinone phénol phloroglucine pyrogallol résorcine.-

Si nous envisageons maintenant les corps que nous avons personnellement étudiés nous constatons que :

Le thymol, meilleur antiseptique que le phénol, se montre aussi plus efficace lorsqu'il est associé au sulfanilamide : la bactériostase est plus prolongée et s'obtient déjà avec des concentrations nettement moindres en ces deux agents.-

De même l'acide salicylique est plus actif que le phénol et son association au sulfanilamide est également plus efficace que l'association phénol-sulfanilamide.-

L'acide benzoïque se comporte sensiblement comme l'acide salicylique; cependant son association avec le sulfanilamide renforce l'action antibiotique moins nettement que ne le fait l'acide salicylique.- L'existence de la fonction phénol n'est donc pas nécessaire pour réaliser une synergie avec les sulfamides. Il est d'ailleurs possible que l'acide benzoïque soit transformé en un dérivé oxhydrylé (donc en un phénol à l'état naissant) par le métabolisme bactérien. STANIER (II2) en effet, a montré que chez *Pseudomonas* l'acide benzoïque était susceptible de donner naissance à du pyrogallol.-

L'acide acétylsalicylique, médiocre antiseptique par lui-même, renforce, de façon manifeste, l'action bactériostatique du sulfanilamide, peut-être parce qu'il libère de l'acide salicylique à l'intérieur même des germes microbiens.

L'acide gentisique, proche parent de l'acide salicylique ne renforce pas l'action des sulfamides.

L'acide p. aminosalicylique ne renforce jamais l'action des sulfamides et même se comporte parfois en antisulfamide (comme P.A.B.), levant de façon spectaculaire l'inhibition qu'eût provoquée le sulfamide employé seul.

Le tanin, malgré ses nombreuses fonctions phénol, ne paraît pas modifier nettement l'action des sulfamides.

C H A P I T R E I V

ASSOCIATION DE CERTAINS REDUCTEURS AVEC LES SULFAMIDES

-:-:-:-:-:-:-:-

A) EFFET DU METHYLENE SULFOXYLATE DE SODIUM

Le méthylène sulfoxyrate de Na est un puissant réducteur, très employé dans l'industrie, en particulier sous les noms de Rongcol ou de Rongalite. Ce corps, chimiquement si actif, a pu être utilisé à doses relativement considérables chez l'homme par voie buccale et même en injection intraveineuse (1); son peu de toxicité pourrait peut-être s'expliquer par l'impossibilité de pénétrer à l'intérieur des cellules (mais nous ne croyons pas que cela ait fait l'objet d'études spéciales).

(1) par exemple dans le traitement de l'intoxication mercurielle comme l'ont proposé HESSE et ROSENTHAL - voir en particulier J. LEVY-VALENSI - L. JUSTIN - BESANCON, A. ABADI et F. KAYSER (néphrite mercurielle aiguë) Bull. Mens. Soc. méd. Hop. Paris 1935)

T A B L E A U N° 9

Temps en Heures	T	S	Densités optiques (x 100) des tubes conte- nant de la Rongalite (P) seule ou associée (SP) à un sulfamide (thiazomide à 0,0002 g.p.100)	1	2	3	4	5	6	7
48	26	-	P	22	20	18	14	13	7	4
24	22	14	SP	13	13	10	10	6	4	4
48	26	17	SP	15	15	11	10	8	5	4
concentrations de Rongalite en g. %				0,001	0,005	0,01	0,05	0,1	0,5	1

Le tableau n° 9 montre que le méthylène sulfoxyate de Na est un antibactérien peu actif puisque son effet ne devient important que pour des concentrations supérieures à 1 pour 1000. Il n'a d'ailleurs jamais été préconisé à notre connaissance, comme antiseptique. Associé au thiazomide, il n'en renforce l'action bactériostatique que pour des concentrations relativement élevées (supérieures à 0,01 g.p.100); l'action n'est pas encore considérable pour des concentrations dix fois supérieures.

B) EFFET DE L'ARSENITE DE SODIUM

Les arsénites sont des poisons protoplasmiques qui inhibent de nombreux enzymes. Leur point d'attaque est différent de celui des sulfamides de sorte qu'il nous avait paru possible a priori, que des phénomènes de potentialisation puissent être mis en évidence.-

Le fait que des sulfamides contenant de l'Arsenic se soient montrés treponimicides (89) nous avait paru encourageant.

T A B L E A U N° 10

temps : en : T : S : heures :	:Densités optiques (x 100) des tubes :contenant arsenite seul(P) ou asso- :cié(SP) au sulfamide(thiazomide à :0,0004%)				
	1	2	3	4	5
48 : 23 : - : P :	23	23	23	11	3
24 : 20 : : SP :	7	6	5	4	2
48 : 23 : : SP :	10	9	9	5	2
conc.arsenite g. % :	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1

Le tableau n° 10 montre qu'il faut atteindre une concentration de 0,05 g.p.100 pour que l'effet antiseptique de l'arsenite se fasse sentir.- L'association avec le thiazomide ne renforce pas sensiblement l'effet de ce dernier. Nous avons pourtant noté un cas favorable, l'arsenite à 0,05 g.p.100, employé seul ne donne, en 48 heures, qu'une densité optique de 11, le thiazomide employé seul, une densité optique de 10 et l'association de ces deux agents ne fournit qu'un développement bactérien insignifiant (densité optique 5).

X
X X

En résumé = Des réducteurs aussi énergiques que l'arsenite de sodium et même que le méthylène sulfoxyrate de sodium, n'influent pas de façon notable sur l'action antibiotique du thiazomide.-

C H A P I T R E V

ASSOCIATION DE CORPS OXYDANTS AVEC LES SULFAMIDES -:-:-:-

Après avoir essayé les réducteurs et avoir montré leur faible efficacité dans le renforcement de l'action bactériostatique des sulfamides, il était naturel d'envisager l'action des oxydants.

Le chlorate de potassium a été un si puissant synergique de l'action des sulfamides (du moins in vitro) que nous avons essayé, à sa suite, un grand nombre d'oxydants : chloramide - iodate - nitrate - arseniate - permanganate - persulfate - perborate.-

A) EFFET DU CHLORATE DE POTASSIUM

Le chlorate de potassium (ClO_3K) est un sel bien cristallisé, assez soluble dans l'eau, dont les effets antiseptiques sont connus depuis longtemps, mais passent pour être faibles, plusieurs milliers de fois inférieurs à ceux du chlorure mercurique.

L'action du chlorate a été rapportée à l'oxygène naissant qu'il serait susceptible de libérer dans certaines conditions, au contact des tissus septiques et non au contact des tissus sains. Cette décomposition du chlorate n'est jamais intense puisqu'on retrouve toujours chez l'homme dans l'urine, 90 à 95 p.100 du chlorate ingéré. Il était loisible de penser que les sulfamides pourraient activer la décomposition du chlorate par les tissus vivants et provoquer la formation d'oxygène naissant dont le pouvoir antiseptique est bien connu. Quoiqu'il en soit du mécanisme d'action possible, l'association du chlorate au thiazomide s'est montrée beaucoup plus efficace que ces deux agents employés seuls : la potentialisation des effets antibiotiques est, dans ce cas, manifeste.

T A B L E A U N° 11

temps en heures :	T :	S :	Densités optiques (x 100) des tubes contenant ClO ₃ K seul (P) ou associé (SP) au sulfamide (thiazomide)							
°) thiazomide 0,0002 g.p.100 avec Esch. Coli										
				1	2	3	4	5	6	7
24	I4	-	P	10	11	I4				
24	I4	11	SP	aucun développement bactérien						
48	20	I6	SP	I2	0	0				
°) thiazomide 0,0002 g.p.100 avec S. typhi murium										
24	28	-	P	23	I4	I5	I5	I3	9	8
48	34	-	P	33	23	25	20	24	21	21
24	28	22	SP	I9	I2	4	I	2	2	0
48	34	29	SP	21	I6	8	2	6	6	0
°) thiazomide 0,0004 g.p.100 avec Esch. Coli										
24	22	-	P	20	4	0	0	0	0	0
48	23	-	P	23	23	I8	0	0	0	0
24	22	8	SP	aucun développement bactérien						
48	23	I2	SP	aucun développement bactérien						
°) thiazomide 0,002 g.p.100 avec Esch. Coli										
24	22	-	P	20	4	0	0	0	0	0
48	23	-	P	23	23	I8	20	0	0	0
54	23	-	P	23	23	I8	20	20	22	I8
48	23	4	SP	aucun développement bactérien						
54	23	I3	SP	aucun développement bactérien						
conc. ClO ₃ K g. %				0,0001	0,0005	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1

Le tableau n° II résume un certain nombre de nos observations. On voit qu'à la concentration, d'ailleurs relativement forte, de 0,002 g.p.100 l'action du thiazomide est renforcée par la présence du chlorate; n'importe quelle concentration en ClO_3K comprise entre un millièrme et un millionième qui, par elle-même, ne produit qu'une inhibition passagère de Esch. Coli, empêche le développement microbien, pendant 54 heures au moins, si le milieu contient en outre du thiazomide (0,002 g.p.100).-

Avec des concentrations beaucoup plus faibles en thiazomide (jusqu'à 0,0002 g.p.100), à peine bactériostatiques par elles-mêmes, le chlorate, à des concentrations supérieures au cent millièrme (Esch. Coli) ou au dix millièrme (S. typhi murium), inhibe complètement le développement microbien pendant 48 heures au moins.-

Avec une concentration en thiazomide deux fois plus faible, les résultats obtenus sont encore très satisfaisants : si la bactériostase n'est pas complète à la 48ème heure, le développement microbien n'en est pas moins très nettement atténué comme le montre le tableau n° I2.

T A B L E A U N° I2

temps :	:	:	:	Densités optiques (x 100) des tubes contenant ClO_3K seul (P) ou associé au sulfamide (SP) (thiazomide à 0,0001 %)				
en :	T :	S :	:	:	:	:	:	:
heures :	:	:	:	:	:	:	:	:
				1	2	3	4	5
48	I5	-	P	I2	II	IO	IO	IO
48	I5	I2	SP	7	6	6	4	5
conc. ClO_3K en g. %	:	:	:	0,00001	0,00003	0,00005	0,00008	0,0001

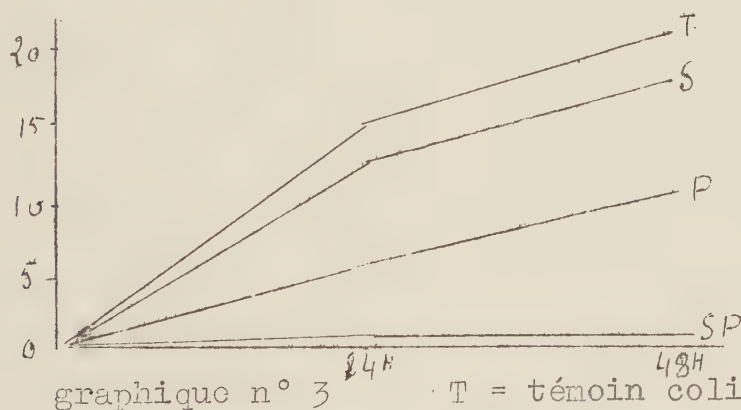
Nous avons voulu aller encore plus loin et tenter de mettre en évidence, une action renforçatrice de l'action du thiazomide lorsque celui-ci est employé à des concentrations moindres encore que dans l'essai précédent. Les résultats

figurent au tableau n° 13; ils montrent encore une ébauche de synergie, tous les chiffres d'opacité des tubes contenant l'association chlorate-thiazomide sont inférieurs à ceux des tubes ne contenant qu'un seul de ces agents.

T A B L E A U N° 13

temps :	:	:	:	Densités optiques (x 100) des tubes contenant ClO_3K seul (P) ou associé (SP) au sulfamide (thiazomide à 0,00005 %)				
en :	T :	S :	:	:	:	:	:	:
heures :	:	:	:	:	:	:	:	:
				1	2	3	4	5
48	I5	-	P	I2	11	10	10	10
48	I5	I2	SP	11	8	8	8	7
conc. ClO_3K en g. %				0,00001	0,00003	0,00005	0,00008	0,0001

A titre d'exemple, nous donnons un graphique qui illustre les résultats très nets que nous avons obtenus grâce à l'association de concentrations peu actives par elles-mêmes de thiazomide et de chlorate.-



T = témoin colibacille
 S = 0,0002 g.p.100 thiazomide
 P = 0,0008 g.p.100 ClO_3K
 SP = association thiazomide- ClO_3K

Ces résultats si nets nous ont incité à rechercher si l'association du chlorate aux sulfamides offrirait également des avantages appréciables in vivo; aussi, avons-nous injecté à des lots de souris, au moment où on les inoculait avec

S. typhi murium, du chlorate, du thiazonide ou ces deux agents associés. Les conditions expérimentales sont identiques à celles que nous avons précédemment indiquées à propos des essais in vivo réalisés avec le salicylate de sodium (voir page 29). Les souris étaient inoculées avec 0.01 cm^3 de suspension d'une culture de 24 heures de *S. typhi murium* sur milieu synthétique. Les animaux qui n'ont pas été traités après l'inoculation sont tous morts en moins de 24 heures; de même, les trois souris inoculées, qui n'avaient reçu que du chlorate de potassium (10 mg.), sont mortes en 24 heures.

Le tableau ci-dessous résume nos résultats :

T A B L E A U N° 14

		:chlorate:	animaux morts en :			
		: en mg. :	24 H.	48 H.	72 H.	:Mortalité
thiazonide	0	:	2	1	-	: totale
	3	:	3	-	-	: totale
	6	:	2	1	-	: totale
	10	:	-	2	2	: totale
1 mg.		:	:	:	:	:
thiazonide	0	:	2	-	1	: totale
	3	:	1	1	1	: totale
	6	:	2	-	1	: totale
	10	:	1	2	1	: totale
2 mg.		:	:	:	:	:
thiazonide	0	:	2	-	1	: totale
	3	:	2	-	1	: totale
	6	:	2	-	1	: $\frac{3}{4}$
	10	:	1	-	-	: $\frac{1}{4}$
3 mg.		:	:	:	:	:

Ce tableau montre que, sur les 48 souris en expérience, quatre ont survécu plus de trois jours : ce sont des animaux qui ont reçu les doses maxima de sulfanide et de chlorate associées, ce qui est donc favorable à la thèse selon laquelle l'association serait plus efficace que chacun des médicaments employés seuls.-

Si nous avons arrêté notre observation 48 heures après l'inoculation, nous aurions vu que :

1°) parmi les souris ayant reçu 1 mg. de thiazomide, deux animaux survivaient, ceux qui avaient reçu en même temps 10 mg. de chlorate.

2°) parmi les souris ayant reçu 2 mg. de thiazomide, le chlorate ne semble pas avoir modifié la mortalité.

3°) parmi les animaux ayant reçu 3 mg. de thiazomide, le chlorate a joué nettement un rôle protecteur.-

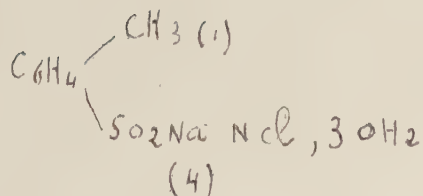
Le tableau montre nettement, de plus, que, même quand l'association sulfamide-chlorate n'a pas assuré la guérison, elle a prolongé la vie.-

Il aurait été souhaitable de ne pas se borner à une injection, mais de répéter le traitement, de façon à maintenir toujours, dans l'organisme de la souris, une concentration efficace en antibiotique -

Comme dans le cas des autres essais in vivo que nous avons relatés, (salicylate page 29) (aspirine page 34), les animaux traités ont été trop peu nombreux pour permettre de tirer une conclusion; nous pouvons seulement dire que les résultats de nos expériences in vivo sont plutôt en faveur de l'efficacité de la synergie sulfamide-chlorate.

Nous pouvons donc, en conclusion, affirmer l'effet remarquable de l'association du chlorate de potassium au thiazomide tout au moins in vitro. Ces résultats nous ont un peu surpris, car en entreprenant ce travail nous ne pensions pas que le chlorate apporterait un renforcement aussi considérable de l'activité manifestée par le thiazomide. A quoi est dû le pouvoir adjuvant du chlorate? nous avons pensé que ce produit agissait par ses propriétés oxydantes et cela nous a amené à étudier d'autres associations du thiazomide avec des corps oxydants. Disons tout de suite que les résultats obtenus n'ont pas, dans tous les cas, été ceux que nous avions escomptés, ainsi que nous allons rapidement le montrer maintenant.-

B) EFFET DE LA CHLORAMINE T



C'est une poudre blanche, très soluble dans l'eau et dont la solution reste longtemps stable. Antiseptique quatre fois plus actif qu'un hypochlorite de même teneur en chlore actif, parce que ce chlore se dégage lentement au contact des cellules et qu'il agit donc de façon plus prolongée, plus efficace.

La toxicité de la chloramine sur Esch. Coli a été étudiée en particulier par BUTTERFIELD et WATTIE (9 - I22).

La chloramine est un antibactérien actif, puisque, employé seul, dans nos conditions expérimentales, il empêche le développement de Esch. Coli pendant 48 H. au moins, dès que la concentration réalisée est supérieure à 0,001 g.p.100. Ce sont donc des concentrations inférieures dont nous avons étudié l'association avec des sulfamides dans le but d'augmenter le pouvoir antibiotique de ces corps. Les résultats sont indiqués dans le tableau n° 15.

T A B L E A U N° 15

conc: en sulfamide %	temps en heures	T	S	Densités optiques (x 100) des tubes con- tenant de la chloramine seule (P) ou as- sociée(SP) au sulfamide (thiazomide)					
					1	2	3	4	5
	48	24	-	P	I9	I8	I6	I8	0
0,0002 %	24	I5	II	SP	I3	4	2	0	0
0,0002 %	48	24	I4	SP	I4	I2	I2	0	0
0,0004 %	24	I8	5	SP	0	0	0	0	0
0,0004 %	48	24	II	SP	I0	I2	0	0	0
conc.chloramine en g. %					0,00001	0,00005	0,0001	0,0005	0,001

On voit qu'aux concentrations où la chloramine n'est plus inhibitrice par elle-même et où le thiazomide n'est plus nettement inhibiteur, l'association de ces deux agents donne une bactériostase complète pendant 48 heures tout au moins. Nous obtenons ici des résultats analogues à ceux trouvés avec le chlorate, bien que la synergie ne se manifeste pas pour des concentrations aussi faibles que celles utilisées avec ce dernier corps.

C) EFFET DE L'IODATE DE POTASSIUM

On pouvait se demander si le bromate et l'iodate, bien que plus stables que le chlorate, jouiraient de propriétés analogues à celles de ce dernier, encore que leur pouvoir antiseptique soit reconnu comme étant plus faible.-

T A B L E A U N° 16

temps : en : T : S heures :	:	:	:	Densités optiques (x 100) des tubes contenant de l'iodate seul (P) ou associé (SP) au sulfamide (thiazomide 0,0002 %)						
	:	:	:	1	2	3	4	5	6	7
48	25	-	P	20	14	16	4	6	4	3
24	25	I2	SP	6	5	2	3	3	2	0
48	25	I5	SP	10	10	11	3	3	2	0
conc. iodate g. %				0,0001	0,0005	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1

Aux concentrations comprises entre 0,0001 et 0,001 g.p.100 l'iodate est légèrement antiseptique. Associé à une concentration elle même peu active de thiazomide, il provoque une inhibition un peu plus marquée du développement bactérien; aux concentrations plus élevées, l'iodate est nettement antibactérien et son action n'est pas augmentée par la présence de thiazomide.

On peut donc conclure que le pouvoir antiseptique propre de l'iodate, contrairement à celui du chlorate, n'est pas susceptible de renforcer notablement l'action bactériostatique des sulfamides.-

D) EFFET DU NITRATE DE POTASSIUM

Le nitrate de potassium (NO_3K) se présente sous la forme de cristaux blancs, existant parfois à l'état naturel, solubles dans l'eau, dont on utilise surtout le pouvoir diurétique en thérapeutique; le nitrate peut être partiellement réduit en nitrites dans l'organisme; c'est un oxydant énergique, moins actif cependant que le chlorate.

T A B L E A U N° 17

temps en heures	T	S	Densités optiques (x 100) des tubes contenant NO_3K (P) seul ou associé (SP) à un sulfa- mide (thiazomide à 0,0002 g.%)					
				1	2	3	4	5
48	22	-	P	22	21	21	21	16
24	17	10	SP	9	11	10	8	8
48	22	16	SP	13	15	16	10	10
conc. NO_3K g. %				0,001	0,005	0,01	0,05	0,1

Bien que le nitrate soit plus stable que le chlorate et l'iodate, nous avons voulu en faire l'essai - Le nitrate employé seul, ne devient légèrement inhibiteur qu'à relativement forte concentration (0,1 g.p.100); il renforce légèrement l'action bactériostatique du thiazomide; ainsi, le thiazomide à 0,0002 g.p.100 associé au nitrate à 0,05 ou à 0,1 g.p.100 ne possède au bout de 48 Heures, qu'une densité optique de 10, alors que dans les tubes contenant le nitrate seul ou le thiazomide seul, la prolifération du Colibacille a été bien plus nette.-

E) EFFET DE L'ARSENIATE DE SODIUM

L'arséniate pouvait être synergique du sulfamide, à la fois parce qu'oxydant (comme les nitrates, chlorates et iodates) et parce que les composés arsénicaux, sont des toxiques cellulaires, ainsi que nous l'avons rappelé à propos de l'essai des arsénites (voir page 42).

L'arséniate, aux concentrations choisies (0,01; 0,05; 0,1 g.p.100) ne s'est pas montré nettement antibactérien - Le thiazomide, à la concentration 0,0002 g.p.100, a été légèrement efficace (densité optique 15 en 48 H., celle du témoin étant 22) - L'association du thiazomide à l'une quelconque des trois concentrations d'arséniate mentionnées ci-dessus n'a pas abouti à un renforcement de l'action antibiotique.-

F) EFFET DU PERMANGANATE DE POTASSIUM

On reconnaît au permanganate de potassium des propriétés antiseptiques qui le font employer par voie externe - GOLDBERGER (27) a montré que, dans le traitement de certaines blessures et infections chirurgicales, l'association sulfanilamide-sulfathiazol était rendue plus efficace par addition d'un corps à propriétés oxydantes, en particulier par MnO_4K utilisé en solution. Il y aurait non seulement un simple effet additif, mais une potentialisation des effets qu'aurait produit chaque corps utilisé seul.

T A B L E A U N° 18

ps n res		: T : S		:Densités optiques (x 100) des tubes contenant : MnO_4K seul (P) ou associé(SP) au sulfamide :(thiazomide 0,0002 g. %)						
				<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>
8	22	-	P	19	19	20	18	18	17	17
4	17	10	SP	8	6	6	6	9	8	2
8	22	13	SP	11	10	9	9	10	8	2
c. MnO_4K g. %				0,00001	0,00005	0,0001	0,0005	0,001	0,005	0,01

Dans les conditions de nos essais et pour des concentrations supérieures au dix millième, le permanganate de potassium s'est montré fortement antiseptique; il se décolorait avec le temps et empêchait la prolifération bactérienne. Aux concentrations inférieures ou égales à 0,01 g.p.100, le permanganate de potassium n'a, par lui-même, qu'une action antibactérienne faible-

Il n'a augmenté nettement la bactériostase, que le thiazomide aurait pu provoquer, qu'à la concentration de 0,01 g.p.100 - Il y a là une synergie manifeste de ces deux agents; employés isolément, ils laissent obtenir des densités optiques de 13 et de 17; associés, la densité optique obtenue est de 2, c'est-à-dire que le développement ne se produit pas, tout au moins pendant les 48 premières heures.-

G) EFFET DU PERSULFATE D'AMMONIUM

Ces cristaux blancs, très solubles dans l'eau, sont nettement bactéricides en solution à 5 p.100, mais ils sont déjà actifs à concentrations bien moindres.-

Dans nos conditions expérimentales, le persulfate d'ammonium s'est montré sans action antiseptique, jusqu'à des concentrations de un pour deux mille; au millième, le persulfate d'ammonium a été légèrement antiseptique.-

Associé au thiazomide à 0,0002 g.p.100, il n'a pas(ou à peine) modifié l'intensité de la bactériostase que ce dernier, employé seul, aurait pu provoquer.-

H) EFFET DU PERBORATE DE SODIUM

Le perborate de sodium se présente sous la forme de cristaux blancs, très solubles dans l'eau, dégageant facilement de l'oxygène au contact des matières organiques (d'où son emploi dans le blanchissage); il a aussi de ce fait un léger pouvoir antiseptique.

Le perborate de sodium a été essayé à des concentrations variant entre le millième et le dix-millionième; employé seul, il ne modifie pas apparemment le taux du développement bactérien; associé au thiazomide, il n'augmente pas sensiblement la bactériostase que ce sulfamide amène, lorsqu'il agit seul.-

T A B L E A U N° 19

temps :	:	:	Densités optiques (x 100) des tubes contenant	:	:	:	:	:	:	:
en :	T :	S :	du perborate de Na seul (P) ou associé (SP) à	:	:	:	:	:	:	:
heures :	:	:	un sulfamide (thiazomide à 0,0002 g. %)	:	:	:	:	:	:	:
:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
:	:	:	:	1	2	3	4	5	6	7
48	27	-	P	22	21	23	23	21	24	22
48	27	18	SP	15	15	17	17	16	17	17
conc. perborate g. % :				0,00001	0,0001	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1

X
X X

CONCLUSION DE CE CHAPITRE

Parmi les oxydants essayés, le chlorate de potassium et la chloramine T se sont montrés des agents qui, in vitro, renforcent très notablement l'action antibiotique des sulfamides (les quelques essais faits avec le chlorate, in vivo, montrent une synergie bien moins nette). Le permanganate est moins actif dans ce sens - L'iodate, le nitrate, l'arséniate, les perborate et persulfate ne renforcent qu'un peu l'action des sulfamides ou sont sans action -

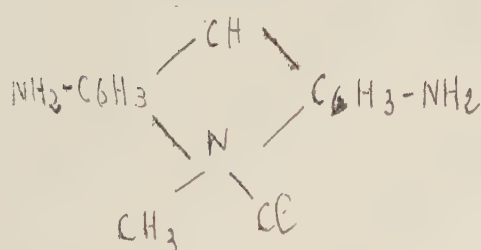
Les oxydants étudiés ne se comportent donc pas, vis-à-vis des sulfamides, de façon univoque, soit qu'intervienne la stabilité de l'oxydant, soit que l'action si nette du chlorate et aussi celle de la chloramine doivent être imputées à une propriété autre que leur caractère oxydant.-

-:-:-:-:-

C H A P I T R E VI

ASSOCIATION DE CERTAINS COLORANTS AVEC LES SULFAMIDES

A) EFFET DE LA GONACRINE



Ce colorant de la série de l'acridine (c'est le chlorhydrate de 3-6 diamino 10 méthylacridine), très soluble dans l'eau, donne une solution jaune fluorescente aux propriétés antiseptiques marquées puisqu'on l'emploie en thérapeutique en solu-

tions aqueuses à 0,025 g.p.100; l'origine de ce pouvoir antiseptique n'est pas connue avec précision et on le rapporte parfois aux dimensions de la partie plane de la molécule ou à son échange avec des cations intracellulaires (1).- L'acridine se combinant à l'acide nucléique, il est possible que son action, bactériostatique ou bactéricide selon la dose, soit explicable de ce fait (72).

On a montré (40) que certaines cellules entraînées à résister aux sulfamides (c'est-à-dire ayant acquis la sulfamidorésistance) perdent cette propriété en présence de dérivés de l'acridine. Il nous a donc paru intéressant d'étudier l'action de la gonacrine, à diverses concentrations, seule ou lorsqu'on l'associe à un sulfamide. MARTIN (70) a déjà indiqué que l'activité des sulfamides était décuplée par association avec l'acridine.- D'ailleurs l'association sulfathiazol-proflavine a été abondamment utilisée par les Alliés durant la guerre sous le nom de "Poudre SP" ou de "Flavasol" comme antiseptique de contact.-

Les seuls résultats qui méritent d'être mentionnés ici figurent dans le tableau n° 20.

Ce tableau nous montre que la gonacrine, employée seule, aux concentrations comprises entre 0,001 et 0,0001 g.p.100, est à peu près aussi active que le thiazomide utilisé à la dose de 0,002 g.p.100; mais l'association de ces deux corps n'aboutit à un renforcement de leur action bactériostatique, que lorsque

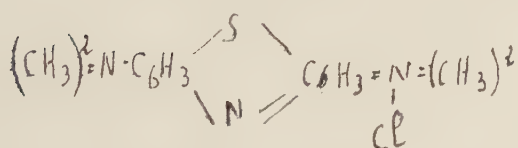
la concentration en gonacrine atteint 0,005 g.p.100.-

Aux concentrations comprises entre le dix millième et le millionième la gonacrine seule est de moins en moins active et son association au thiazomide (0,0002 g.p.100) ne modifie pas l'action bactériostatique de ce dernier. Nous ne retrouvons donc pas les résultats annoncés par MARTIN; dans nos conditions expérimentales, la synergie n'a été observée que pour des concentrations variant dans d'assez étroites limites, et elle n'a généralement pas été très intense.

T A B L E A U N° 20

concent. sulfamido %	temps en heures	T	S	Densités optiques (x 100) des tubes contenant de la gonacrine seule (P) ou associée (SP) au thiazomide à 0,002 g. %				
					1	2	3	4
0,002	48	22	-	P	I4	I3	I2	8
0,002	24	I4	8	SP	8	I0	I	0
0,002	48	22	I6	SP	I4	I6	8	I
conc. gonacrine en g. %					0,0001	0,0003	0,0005	0,001

B) EFFET DU BLEU DE METHYLENE



Le bleu de méthylène est un colorant de la série de la phénothiazine, assez soluble dans l'eau et qui possède des propriétés antiseptiques. Il pénètre à l'intérieur

des cellules, c'est un colorant vital. Il se réduit facilement en leucodérivé pour des r H à peine inférieurs au r H des cellules et des milieux de cultures. On pouvait penser que le bleu de méthylène agirait sur la vie cellulaire en présence de sulfamides puisque la respiration cellulaire des bactéries est troublée par ces médicaments.

En fait il y a diminution de la consommation d'oxygène et BAKER et MICHAELIS (3) ont montré qu'il y avait synergie entre ce colorant et la sulfapyridine vis à vis de *Pseudomonas*.

GEORGE et RANDALAL (26) ont montré, qu'en présence de certains colorants bactériostatiques, tels que le bleu de méthylène, le vert brillant et le violet de gentiane, on pouvait diminuer considérablement la concentration de pénicilline nécessaire pour inhiber le développement des microorganismes.-

Nous avons remarqué que le bleu de méthylène, employé seul, inhibait le développement bactérien pendant 48 H. au moins lorsqu'on utilisait des concentrations supérieures ou égales à 0,05 g.p.100. La présence de thiazomide maintient cette bactériostase.

A des concentrations inférieures, le colorant employé seul retarde légèrement (ou ne retarde pas) le développement bactérien; en même temps les tubes se décolorent, c'est-à-dire que le r H du milieu diminue et que le colorant se transforme en leuco dérivé (96). La décoloration est progressive et n'est pas toujours complète (même en profondeur), cela dépend de la concentration employée et du temps au bout duquel se fait l'observation.-

GOMES DA COSTA (28) a montré que le sulfamide n'influencait pas la décoloration du bleu de méthylène.-

La mise en évidence de la prolifération bactérienne et sa mesure sont difficiles en raison des colorations plus ou moins intenses présentées par les différents tubes.-

Nous avons cherché à décolorer les tubes au moment de la lecture opacimétrique, mais les réducteurs employés ou bien sédimentaient les germes (bisulfite) ou bien donnaient un précipité (chlorure stanneux). Nous avons alors effectué des numérations sur des cultures diluées, dans un hématimètre de MALASSEZ, et nous avons fait, sur un grand nombre de tubes, la constatation suivante : dans les tubes qui conservent leur couleur bleue originelle, le développement bactérien est réduit, il est de l'ordre de 6 à 7.000 germes par mm³.

Au contraire dans les tubes totalement décolorés, que ce soit en présence ou en absence de thiazomide, le nombre de germes oscille entre 1.200.000 et 1.500.000 par mm^3 . Dans les tubes partiellement décolorés, la population bactérienne est à peine moins abondante (1.000.000 par mm^3); on trouve des nombres du même ordre pour les tubes contenant du thiazomide à 0,0002 g.p.100 sans bleu de méthylène, au bout de 48 heures de culture, la bactériostase primitive ayant cessé.-

Ces constatations nous ont permis de faire une estimation grossière du développement microbien par l'appréciation de la décoloration, plus ou moins rapide, plus ou moins complète, des tubes en expérience.-

Nous en avons conclu qu'aux concentrations comprises entre 0,0001 et 0,05 g.p.100 le bleu de méthylène n'était pas inhibiteur par lui-même; associé au thiazomide (0,0002 g.p.100) il renforce l'action de ce dernier, c'est-à-dire que le développement microbien ne devient apparent qu'après 48 heures.

La synergie bleu de méthylène-thiazomide n'est donc pas très intense et elle ne se manifeste que dans une zone assez limitée de concentrations en bleu de méthylène.-

C H A P I T R E VII

ASSOCIATION DE CERTAINES VITAMINES AVEC

LES SULFAMIDES

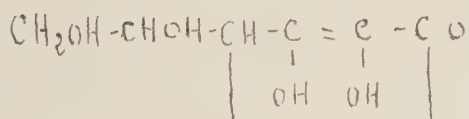
=====

Nous n'avons étudié l'association de sulfamides qu'avec un petit nombre de vitamines - A priori, on pouvait penser qu'on assisterait à la levée de la bactériostase due aux sulfamides, puisqu'on fournissait au microorganisme, en administrant une vitamine, un moyen supplémentaire de tourner les difficultés que la présence du sulfamide fait surgir dans le déroulement normal des phénomènes métaboliques.- D'ailleurs, différents auteurs ont déjà étudié la question, et SEVAG (99) pensait que sulfamides et coenzymes, (c'est-à-dire, dans bien des cas, vitamines), pouvaient entrer en compétition vis à vis d'un apoenzyme cellulaire.

C'était une raison de plus de penser que sulfamides et vitamines pourraient être antagonistes. Nous avons néanmoins voulu essayer l'association des sulfamides aux vitamines, pensant que, suivant les concentrations, nous pourrions déceler synergie ou antagonisme.-

Nous avons fait choix de trois vitamines, donnant facilement des formes oxydées ou réduites, soit in vivo, soit sous l'influence de réactifs chimiques : les vitamines C, B₁ et B₂ -

A) EFFET DE L'ACIDE ASCORBIQUE



L'acide ascorbique (ou vitamine C) est une vitamine hydrosoluble susceptible d'agir comme transporteur d'hydrogène et donc d'inter-

venir dans certaines oxydations cellulaires.

LWOFF et MOREL (64) ont montré que la vitamine C peut présenter, dans certaines conditions une action bactéricide (sur *Proteus vulgaris*) qui est due semble-t-il, à la formation d'eau oxygénée, au cours de son oxydation -

Nous avons déjà rappelé que, dans certaines conditions, les sulfamides agissaient sur les enzymes respiratoires. Il était donc naturel d'essayer si les effets de l'un de ces agents renforçaient ceux que peut produire l'autre. Cette association médicamenteuse a d'ailleurs été déjà utilisée en clinique. PELNER (85) indiquait que des malades, présentant des accidents graves à la suite de l'ingestion de sulfamides, ont pu supporter les sulfamides, si on leur donnait 0,1 g. de vitamine C, toutes les quatre heures -

MOURIQUAND (75) a remarqué que, chez le cobaye, l'intoxication chronique par les sulfamides provoquait des hémorragies ressemblant au scorbut - L'administration d'acide ascorbique prévient et guérit ces hémorragies, même si on donne simultanément un régime scorbutigène - Chez le cobaye, l'acide ascorbique s'oppose donc à certains effets nocifs des sulfamides (11) et c'est ce résultat et non l'obtention d'une action synergique, qu'on semble avoir tenté d'atteindre en médecine humaine -

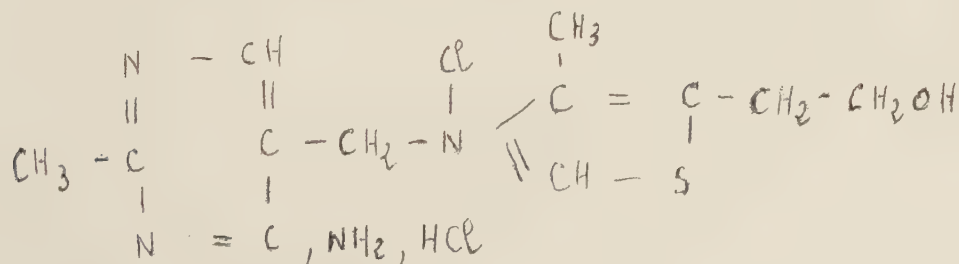
C'est donc sans beaucoup d'espoir que nous avons entrepris nos expériences; on pouvait cependant penser que, si l'on obtenait pour certaines concentrations, une levée d'inhibition, à d'autres concentrations il pourrait y avoir synergie (I4) -

T A B L E A U N° 21

temps : en : heures :	T :	S :	Densités optiques (x 100) des tubes contenant la vitamine C seule (P) ou associée au sulfa- mide (thiazomide à 0,0002 %)								
				1	2	3	4	5	6	7	
48	23	-	P	24	21	17	20	16	20	21	
I6	I4	3		2	2	2	4	4	5	5	
24	I6	9		9	9	I2	II	I3	I3	I2	
48	23	I3		I4	I3	I5	I2	I4	I4	I6	
conc.vitamine C g%	0,0001	0,0005	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1				

On voit donc que, l'acide ascorbique employé seul ne modifie guère le développement de Esch. Coli en milieu synthétique. Nous avons associé l'acide ascorbique à un sulfamide, le thiazomide, employé uniformément à la concentration 0,0002 g.p.100 qui ne provoque qu'une bactériostase peu intense. On voit qu'à aucun moment l'acide ascorbique ne modifie sensiblement le cours de cette bactériostase bien qu'une gamme très étendue de concentrations ait été essayée. Si nous n'avons pas constaté de levée notable de l'inhibition due aux sulfamides, nous n'avons pas non plus assisté à un renforcement de la bactériostase.-

B) EFFET DE LA THIAMINE



La thiamine (ou vitamine B₁) est un facteur de croissance pour beaucoup de microorganismes, son ester pyrophosphorique est le coferment de la carboxylase et joue de ce fait un rôle important dans le métabolisme des glucides; l'association d'un sulfamide avec la thiamine (libre ou à l'état de pyrophosphate) a déjà été étudiée par différents auteurs, entre autre SEVAG (98) et ENGELHARDT (16), et un certain antagonisme entre ces drogues a pu être parfois noté.- Mais on pouvait encore penser, qu'à des doses appropriées, la thiamine agirait aussi d'une autre façon sur la cellule bactérienne. On a montré, par exemple, que cette vitamine renforçait l'action de la novocaïne (procaïne) sans doute parce qu'elle en facilite la pénétration dans la cellule (37); il était possible qu'elle renforce également, par le même procédé, l'action du sulfamide (qui, comme la novocaïne possède un noyau para amino benzoïque).-

Enfin la vitamine B₁ facilement réductible (en dihydrovitamine) et facilement oxydable (en thiochrome) pouvait aussi intervenir lorsque le fonctionnement des enzymes respiratoires était perturbé par la présence de sulfamide.

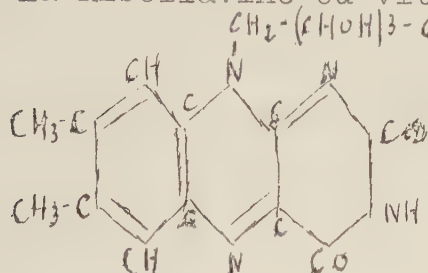
T A B L E A U N° 20

temps :	:	:	:	Densités optiques (x 100)			
en :	T :	S :	:	des tubes contenant thia-			
heures :	:	:	:	mine seule(P)ou associé au			
				sulfamide(SP)(thiazomide			
				0,0004%)			
				1	2	3	4
48	32	-	P	20	19	18	20
24	27	7	SP	6	5	4	5
48	32	18	SP	20	18	15	17
conc.vit.B ₁ g.%				0,01	0,02	0,03	0,04

Nous voyons donc, d'après ce tableau, que l'effet inhibiteur dû à la vitamine B₁ utilisée seule, est peu conséquent.- Dans aucun cas l'association de la vitamine B₁ au thiazomide n'a augmenté de façon notable la bactériostase provoquée par ce sulfamide.-

C) EFFET DE LA RIBOFLAVINE

La Riboflavine ou vitamine



B₂, hydrosoluble, coferment d'enzymes actifs dans la nutrition, ne paraît indispensable que chez un petit nombre d'espèces vivantes; son association avec les sulfamides a déjà été tentée et son rôle d'antagoniste, à certaines

concentrations tout au moins a été mis en évidence (97). C'est un argument que donne SEVAG (99) pour penser qu'il y a compétition entre sulfamides et vitamines (coferments) auprès d'apoenzymes respiratoires. On pouvait cependant penser que la riboflavine, étant facile à oxyder et facile à réduire in vitro, pouvait modifier favorablement le cours de la bactériostase provoquée par les sulfamides.

D'ailleurs JALILI (48) a signalé une synergie entre vitamine B₂ et Pénicilline, dont la cause n'apparaît pas nettement. En clinique humaine, on a indiqué (45) que l'association sulfamide-riboflavine s'est montrée efficace pour guérir une blennorrhagie due à des gonocoques sulfamido-résistants -

Nos essais sont consignés dans le tableau n° 23

T A B L E A U N° 23

temps : en : heures :	T :	S :	Densités optiques (x 100) de la vit. B ₂ seule (F) ou associée (SP) au sulfamide	1	2	3	4	5	6	7
48	32	-		30	32	32	31	31	33	32
24	28	I9	SP	21	20	20	19	18	12	11
48	32	28	SP	28	27	27	26	29	25	26
conc. Riboflavine en g. %				0,00001	0,0001	0,001	0,005	0,01	0,05	0,1

Le tableau n° 23 montre que la riboflavine seule, employée à des concentrations variant entre un dix millionième et un millième, ne présente aucune action antibactérienne, ce qui est conforme aux indications tirées de la bibliographie -

En association avec le thiazomide, la vitamine B₂ ne renforce pas de façon sensible l'action de cet antibiotique; tout au plus, aux concentrations relativement fortes, de un pour deux mille ou de un pour mille note-t-on un net ralentissement de la prolifération bactérienne; celle-ci au bout de 24 heures, ne donne une densité optique que de I1 ou I2, alors que le sulfamide seul donnait I9 au même moment.-

En résumé, ni la vitamine C, ni la vitamine B₁, ni la vitamine B₂ n'agissent nettement sur l'action bactériostatique manifestée par les sulfamides.-

-:-:-:-:-:-:-

C H A P I T R E VIII

ASSOCIATION DE COMPOSES CHIMIQUES DIVERS

AVEC LES SULFAMIDES

=====

A) EFFET DU CHLORURE MERCURIQUE

Le chlorure mercurique (Cl₂Hg - sublimé corrosif) est formé de cristaux assez solubles dans l'eau mais où le mercure est relativement peu dissocié; son action antibactérienne est, malgré cela, considérable parce que très rapide. Le sublimé est surtout bactériostatique; il requiert, pour être germicide, des concentrations assez considérables alors que l'effet bactériostatique est parfois sensible à des dilutions de l'ordre du millionième. Les propriétés antiseptiques des dérivés minéraux ont été récemment passées en revue par WYSS (I25) et par NORTON (8I). Le sublimé a l'inconvénient, in vivo, de se combiner avec facilité aux protéides et donc d'être facilement inactivé; in vitro, en milieu non protéique, il arrive rapidement au contact des protéides des microorganismes et les rend

impropres à assurer leur rôle dans les phénomènes vitaux(I8) - On pouvait espérer que cette action renforcerait l'action antibiotique des sulfamides.

Certains auteurs (9I-I26) ont réalisé des combinaisons sulfamidées, contenant du mercure dans leur molécule.- Nous avons préféré utiliser un mélange de sulfamide et de sel de mercure parce qu'il n'est pas certain que les combinaisons mercurielles possèdent les propriétés du mercure et celles du sulfamide.-

Quelques-uns de ces composés sont utilisés en thérapeutique.

LAMANNA et SHAPIRO (58) ont étudié l'action des sulfamides en présence de Cl_2Hg et ont trouvé des effets variés suivant les conditions.

T A B L E A U N° 24

temps : en : heures :	T :	S :	Densités optiques (x I00) des tubes contenant Cl_2Hg seul (P) ou associé (SP) au sulfamide (thiazomide 0,0002 g. %)	1	2	3	4	5
48	22	-	P	22	I8	I8	I6	I8
24	I5	I0	SP	6	0	0	0	0
48	22	I2	SP	I3	3	2	3	I
conc. Cl_2Hg en g. %				0.000.00I	0.000.005	0.000.0I	0.000.05	0.000.I

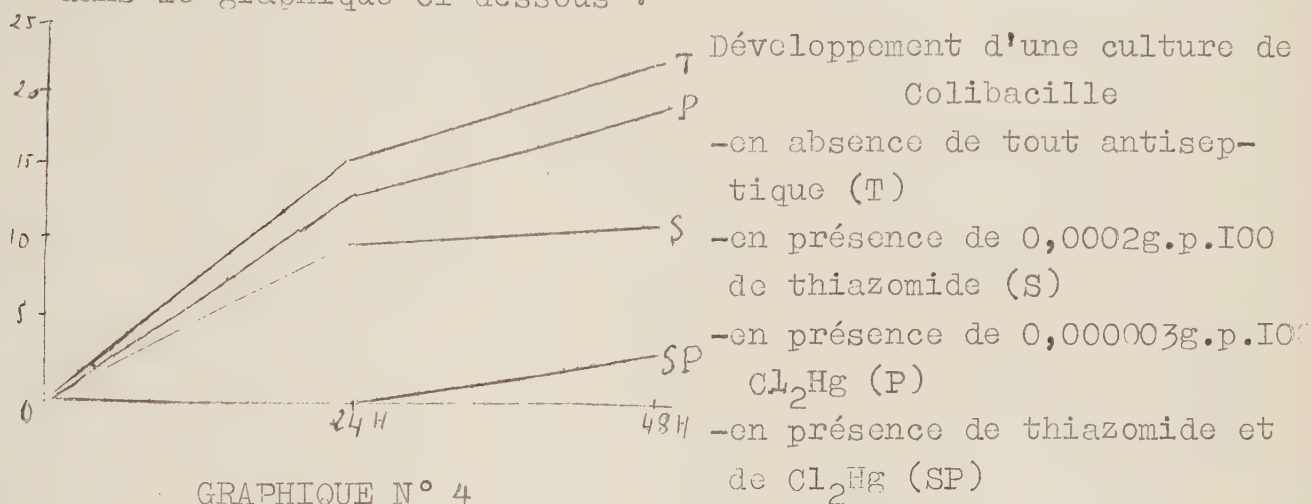
L'addition de doses relativement fortes de sublimé au milieu de culture, pour amener la concentration à être comprise entre 0,0I et 1 g.p.I00, provoque l'apparition d'un précipité (phosphate mercurique).-

Aux concentrations supérieures au millionième, dans nos expériences, le sublimé s'est montré totalement inhibiteur; pendant 48 H.au moins, aucun développement bactérien n'apparaît.-

Aux concentrations inférieures au millionième, l'effet antiseptique du chlorure mercurique n'est plus perceptible, ainsi que cela résulte de la lecture du tableau n° 24 -

Mais à des concentrations, comprises entre le millionième et le cent millionième, l'effet du chlorure mercurique sur le thiazomide est manifeste : aucun développement n'a lieu en 24 heures; en 48 heures il est à peine perceptible.-

Voici un très bel exemple de cette synergie, reproduit dans le graphique ci-dessous :



Il y a donc des possibilités de synergie très nette entre l'action d'un sulfamide et celle du chlorure mercurique, le premier donnant une densité optique de la culture microbienne égale à 12, le deuxième une densité égale à 18, l'association de ces deux agents commence à peine à permettre un développement microbien 48 heures après l'ensemencement.

B) EFFETS DE L'UREE ET DE LA SULFO-UREE

L'urée, ou carbamide $CO(NH_2)_2$ en dehors de son action diurétique, n'a vraiment pas d'effets pharmacodynamiques marquants et elle n'est pas antiseptique. Des travaux publiés par divers auteurs, il résulte que la bactériostase provoquée par les sulfamides peut être modifiée par l'urée, et cela de façon différente suivant les conditions expérimentales -

L'association urée-sulfamide a été étudiée in vitro dès 1940 (111) : l'urée neutraliserait l'action anti-sulfamide

de la méthionine et de P.A.B.. TENENBERG, TSUCHIYA, CLARK et STRAKOSCH (II3-II4) confirment ces résultats, mais LALONDE et GARDNER (57) rapportent des résultats contradictoires(50-61); pourtant in vivo LALONDE, comme d'autres cliniciens(SCHNITKER et LENTHOFF, VESELL et collaborateurs) (IO5-I20), a eu de brillants résultats dans des cas de sulfamidorésistance, grâce à l'association de l'urée au sulfamide.-

Récemment VANLINT et ALERTS (II7) ont étudié l'action conjuguée d'un sulfamide et de l'urée en ophtalmologie.-

D'ailleurs, sur les plaies de guerre, l'association sulfamide urée a été aussi préconisée (82) -

L'urée a de même été associée à la pénicilline (I23) -

Dans nos expériences, l'urée à des concentrations comprises entre 0,0001 et 1 g.p.I00 n'a eu, par elle-même, aucune action sur le développement microbien - En association avec le thiazomide à 0,0002 g.p.I00, l'urée ne nous a pas paru renforcer nettement l'action bactériostatique qu'on aurait obtenue avec le sulfamide employé seul, sauf pour la concentration élevée de 1 p.I00.- Ainsi, le thiazomide seul donne, en 48 heures, une culture de Esch. Coli dont l'opacité est I7; associé à 1 g.p.I00 d'urée, il donne des tubes de densité optique 6 et, associé à 0,0001 g.p.I00 d'urée, il donne des tubes de densité optique I2.-

L'association sulfamide-urée n'a, dans nos expériences, donné qu'une ébauche de synergie -

Des sulfanyl urées ont été essayées en thérapeutique avec un certain succès surtout dans les infections urinaires; on a de même synthétisé des sulfanyls thiourées, tels le Badional (23) et le De Ma (38) qui se sont montrées assez efficaces; c'est pourquoi nous avons cherché les effets de l'association sulfamide-thiourée sur la croissance de Esch. Coli. Nous avons opéré avec des concentrations de thiourée comprises entre 0,0001 et 0,1 g.p.I00 et de thiazomide à 0,0002 g.p.I00; aucun effet net de synergie entre ces corps n'a été noté.-

C) EFFET DES ACIDES NUCLEIQUES

Les acides nucléiques sont formés par la combinaison de nucléotides, dont l'hydrolyse libère en particulier des molécules de bases puriques et pyrimidiques, certaines ont pu être considérées comme douées d'une activité antisulfamide (71) -

Avec SCHOPFER (106) on peut penser que, si la synthèse des purines est troublée par les sulfamides, la synthèse des acides nucléiques le sera aussi.-

Nous avons voulu voir si, dans les conditions de nos expériences, une action antisulfamide était décelable et si, en faisant varier la concentration en acide nucléique, une synergie avec le sulfamide ne pourrait se manifester -

L'acide nucléique, dissous dans du phosphate disodique à 10 % et amené à pH = 7 par addition d'un peu d'acide chlorhydrique dilué, a été ajouté au milieu synthétique; sa présence à des concentrations comprises entre 0,0001 et 0,1 g.p.100 ne modifie pas sensiblement le développement de Esch. Coli - Associé au thiazomide à 0,0002 g.p.100, l'action antibiotique de ce dernier reste inchangée.-

CONCLUSIONS GENERALES

Nous avons étudié systématiquement les modifications apportées par certains corps à l'action que les sulfamides manifestent, in vitro et parfois in vivo, vis à vis des microorganismes qui leur sont sensibles.-

Dans un premier chapitre, nous avons d'abord rappelé quelques généralités sur les associations médicamenteuses, puis nous avons passé en revue les principales données concernant les associations à base de sulfamides; elles peuvent conduire au renforcement ou à l'inhibition de l'action présentée par ces drogues.-

Dans le chapitre II, nous avons indiqué les techniques suivies dans nos recherches. Nous avons employé Esch. Coli ou S. typhi murium; le germe a étéensemencé dans un tube contenant 10 cm³ d'un milieu synthétique au glucose et au sulfate d'ammonium, additionné s'il y avait lieu de sulfanilamide (ou de thiazomide) et de l'agent choisi pour lui être associé. Nous indiquons également la technique suivie dans nos trop peu nombreux essais in vivo, sur la souris.-

Dans les chapitres suivants, les agents étudiés ont été rangés dans des groupes présentant, autant que possible, une unité d'ordre chimique ou pharmacologique :

1) Corps possédant une ou plusieurs fonctions PHENOL :

J. POUCHOL (87) avait déjà montré la synergie possible entre le phénol et les sulfamides, il avait établi que l'hydroquinone était plus active que le phénol; la phloroglucine, le pyrogallol, la résorcine étaient au contraire moins actives.

Nous avons montré que le thymol et l'acide salicylique, meilleurs antiseptiques que le phénol, potentialisent aussi davantage l'action des sulfamides; donc, la présence de chaînes latérales n'empêche pas la synergie d'un phénol avec les sulfamides.-

L'aspirine est également fort active dans ce sens, sans doute par suite de la libération d'acide salicylique naissant, à l'intérieur de la cellule.-

Cependant, la présence d'une fonction phénol n'est pas suffisante pour renforcer l'action bactériostatique des sulfamides : les tanins n'ont qu'une faible activité, l'acide gentisique, l'acide para-amino-salicylique sont inactifs et s'opposent même parfois à la bactériostase que produirait le sulfamide s'il était employé seul.

La fonction phénol qui n'est pas suffisante pour conditionner un renforcement de l'action des sulfamides, n'est pas non plus nécessaire puisque l'acide benzoïque et certains corps que nous mentionnons ci-après peuvent réaliser cette synergie.-

Les résultats expérimentaux de l'association au sulfamide des corps à fonction phénol, sont résumés dans le tableau N° I.

T A B L E A U N° I

PRODUIT ASSOCIÉ AU SULFAMIDE	: conc.en :sulfamide:	:conc.corps: associé :	LA BACTERIOSTASE DUE AU SULFAMIDE EST :
HYMOL (p. 24)	: 0,0004 :à 0,008	: 0,002 : à 0,01	:renforcée sauf aux faibles : doses
c.SALICYLIQUE (p.27)	: 0,002 :à 0,006	: 0,005 : à 0,1	: : d°
c.BENZOIQUE (p. 31)	: 0,006 :à 0,01	: 0,01 : à 0,07	:assez légèrement augmentée
c.ACETYL-SALICYLIQUE (p. 33)	: 0,004 :à 0,006	: 0,004 : à 0,06	:fortement renforcée
c.GENTISIQUE (p. 35)	: 0,002 :à 0,004	: 0,0001 : à 0,1	:à peine renforcée dans les :cas les plus favorables
c.P.AMINOSALICYLIQUE (p. 37)	: 0,0003 :à 0,001	: 0,003 : à 0,1	:plus ou moins complètement : supprimée
TANIN (p. 39)	: 0,002 :à 0,004	: 0,001 :à 0,1	: peu modifiée

2) Corps à propriétés REDUCTRICES ou OXYDANTES accentuées :

L'action antibiotique des sulfamides ne semble pas modifiée de façon nette par le méthylène sulfoxyrate de sodium ou par l'arsénite de sodium.-

De même l'iodate de potassium, le nitrate de potassium, l'arséniate de sodium, le persulfate d'ammonium et le perborate de sodium n'ont eu qu'une action faible.

Par contre, le permanganate de potassium et surtout la chloramine T ainsi que le chlorate de potassium ont présenté une activité renforcatrice nette.

Le tableau N° II donne un aperçu des résultats obtenus lorsque l'on associe ces différents corps au sulfamide aux concentrations indiquées.-

T A B L E A U N° II

PRODUIT ASSOCIE AU SULFAMIDE	: conc.en :sulfamide:	:conc.corps: : associé :	LA BACTERIOSTASE DUE AU SULFAMIDE EST
METHYLENE SULFO- XYLATE DE SODIUM (p. 41)	: 0,0002	: 0,001 : à 1	:renforcée très faiblement :et seulement aux fortes :concentrations
ARSENITE DE SODIUM (p. 42)	: 0,0004	: 0,001 : à 0,1	: généralement non modifiée, : parfois renforcée
CHLORATE DE POTAS- SIUM (p. 44)	: 0,00005 : à 0,002	: 0,00001 : à 0,1	: très fortement accrue
CHLORAMINE T (p. 50)	: 0,0002 : à 0,0004	: 0,00001 : à 0,001	: d°
IODATE DE POTASSIUM (p. 51)	: 0,0002	: 0,0001 : à 0,1	: nullement augmentée
ARSENIATE DE SODIUM (p. 52)	: 0,0002	: 0,001 : à 0,1	: très légèrement renforcée
PERMANGANATE DE POTASSIUM (p. 53)	: 0,0002	: 0,00001 : à 0,1	: favorisée à certaines : concentrations
PERSULFATE D'AMMONIUM (p. 54)	: 0,0002	: 0,00001 : à 0,1	: à peine modifiée
PERBORATE DE SODIUM (p. 54)	: 0,0002	: 0,00001 : à 0,1	: inchangée

3) Deux COLORANTS aux propriétés antiseptiques nettes ont été essayés : l'association de la gonacrine et du bleu de méthylène au sulfamide, n'ont pas provoqué une synergie appréciable (voir tableau N° III)

4) DIVERS

Les Vitamines C, B₁, B₂, les acides nucléiques, la sulfou-rée, ont présenté une action toujours très faiblement renforçatrice de celle des sulfamides; par contre l'urée a eu une action plus nette, bien que modérée.

Le chlorure mercurique s'est révélé, au contraire, capable de potentialiser fortement l'action bactériostatique des sulfamides.-

Nous indiquons dans le tableau N° III les résultats de l'association au sulfamide des composés étudiés dans les chapitres "Colorants" et "Divers".-

T A B L E A U N° III

PRODUIT ASSOCIÉ AU SULFAMIDE	: conc.en :sulfamide:	:conc.corps: associé :	LA BACTERIOSTASE DUE AU SULFAMIDE EST :
GONACRINE (p. 56)	: 0,0002 :à 0,002	:0,000001 :à 0,001	: peu modifiée
BLEU DE METHYLENE (p. 57)	: 0,0002	:0,0001 :à 0,05	:favorisée à certaines :concentrations
VITAMINE C (p. 60)	: 0,0002	:0,0001 :à 0,1	:inchangée
VITAMINE B ₁ (p. 61)	: 0,0002 :à 0,0004	:0,0001 :à 0,1	: d°
VITAMINE B ₂ (p. 62)	: 0,0002	:0,00001 :à 0,1	:légèrement renforcée aux :fortes concentrations
ACIDES NUCLEIQUES (p. 68)	: 0,0002	:0,0001 :à 0,1	:peu modifiée
SULFOUREE (p. 66)	: 0,0002	:0,0001 :à 0,1	:inchangée
UREE (p. 66)	: 0,0002	:0,0001 :à 1	:renforcée seulement aux très :fortes concentrations
CHLORURE MERCURIQUE (p. 64)	: 0,0002	:0,00001 :à 1	:très fortement augmentée

Ainsi donc, nous avons relevé une action fortement synergique de celle des sulfamides :

1) avec certains corps à fonction phénol, mais cette condition n'est ni nécessaire (acide benzoïque), ni suffisante (tanin - acide gentisique - acide para-amino-salicylique).-

2) avec certains oxydants (chlorate de potassium), mais cette propriété n'est également ni nécessaire, ni suffisante.-

Les corps réducteurs essayés n'ont pas été actifs et le fait de présenter des possibilités d'oxydo-réduction dans les conditions biologiques ne conduit pas nécessairement à une action synergique de celle des sulfamides (bleu de méthylène).-

Nos essais in vivo, réalisés dans les cas les plus intéressants (acide salicylique - aspirine et chlorate de potassium), n'ont pas donné de résultats nets, mais ceux-ci sont, malgré tout encourageants.-

Rappelons enfin que les associations étudiées peuvent parfois aboutir, non plus à une synergie, mais à un véritable antagonisme. POUCHOL l'avait déjà mis en lumière à propos de certains phénols, NEUMANN l'avait signalé chez *Aspergillus niger*, également avec des phénols. Nous-même l'avons retrouvé avec l'acide para-amino-salicylique; en effet, P.A.S. n'est jamais synergique des sulfamides, à concentrations convenables il lève l'inhibition de croissance microbienne que ces corps sont capables de provoquer.-

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ALBERT (A.) Brit. J. exp.Path 1949 30 159
- 2 - ARLOING (F.) - THEVENOT (L.) et VIALIER (J.):C.R.Soc.Biol.
1942 - 136 - 601
- 3 - BAKER (B.E.) et MICHAELIS (M.): Nature- 1947 - 159 - 197
- 4 - BHATIA et collab.: cités par CHARNLEY (IO)
- 5 - BIGGER (J.W.): Lancet 1946 - 250 - 81
- 5 bis- BOHMANN (A.): Arch.f.exp.Path.u.Pharm.1944 - 203 - 317
- 6 - BOZZO (A.) et OLIA (A.): Boll.Soc.ital.Biol.sper.1947-23-745
- 7 - BROH-KAHN (R.H.): Science 1939 - 90 - 543
- 8 - BURGI (E.):Die Wirkung der Arzneimittel; Bern 1914 Pflügers
Archiv.d.ges.Physiologie 1922 - 147 - 275
- 9 - BUTTERFIELD (C.T.) et WATTIE (E.):Publ.Health.Rep. 1946 -
61 - 543
- 10 - CHARNLEY (J.): Lancet 1945 - 248 - 772
- 11 - CHAUCHARD (P.): Presse Médicale 1949 p 388 F
- 12 - COOWLES (P.B.): Yale J.Biol.Med. 1942 - 14 - 599
- 13 - DALLEMAGNE (M.J.) et DEROUAUX (G.):Arch.int.Pharmacod.
1946 - 73 - 147
- 14 - DESOROUX (E.) Thèse Pharmacie Nancy 1946, dactylogr.
- 15 - DYAR (M.T.) : J.Bact. 1947 - 53 - 498
- 16 - ENGELHARDT (W.) et HULLSTRUNG (H.):Klin.Woch.1939-18-774
- 17 - FILDES (P.): Lancet 1940 - 1 - 955
- 18 - FILDES (P.) :J.exp.Path. 1940 - 21 - 67
- 19 - FOX (C.L.)et ROSE (H.M.):Proc.Soc.exp.Biol.Med.1942-50-142
- 20 - FOX (C.L.): Science 1940 - 91 - 477
- 21 - FONTANA (F.):Arc.Farmacol.sper.Sci.affini.Ital.1947-76-61
- 22 - FRENCH (F.A.)et FREEDLANDER (B.L.):J.an.Pharm.Ass. 1949 -
38 - 343
- 23 - FRISK (A.R.):Acta.Med.Scand.(suplt) 1943 - 142 - I/199
- 24 - FROLICH et LOEWI (O.):Archiv.f.exp.Path.u Pharm.1910-62-152
- 25 - GALE (E.F.): J. gen.Microbio.1947 - 1 - 77
- 26 - GEORGE (M.) et RANDALAL(K.M.):Nature 1946 - 156 - 709
- 27 - GOLDBERGER (I.A.):An.J.Surgery 1942 - 56 - 353
- 28 - GOMEZ da COSTA (S.F.):Arch.Portug.Sci.Biol.1947/8-2-68
- 29 - GOODMAN (L.) et GILMAN (A.): The pharmacological Basis of
Therapeutics.New-York 1944 p.14
- 30 - GREGOIRE (Ch.):Microscope électronique et Recherches bio-
logiques Paris - Masson éd.1950 p.98

- 31 - GROS (O.) et KOCHMANN (M.): Arch.f.exp.Path.u.Pharm. 1923 - 98 - 129
- 32 - GUERRA (F.) : Science 1946 - 103 - 686
- 33 - HARRIS (O.S.) et KOHN (H.I.): J.biol.Chem. 1941 - 141 - 989
- 34 - HARRIS (I.S.) et KOHN (H.I.): J.Pharmacol. 1941 - 73 - 383
- 35 - HARRIO-JETT: J.am.Med.Ass. 1948 - 137 - 363
- 36 - HAZARD (R.): Précis de Thérapeutique et de Pharmacologie.
Paris. Masson éd. 1950
- 37 - HAZARD (R.) et VAILLE (Ch.): C.R.Soc.Biol. 1945 - 139 - 535
- 38 - HEILMEYER (L.) et KEIDERLING (W.): Dtsch.Med.Woch. 1947 - 72 - 13
- 39 - HENDRY (R.W.) GLEDHILL (W.C.) et PRICE (B.H.) : Cités par
CHARNLEY (10)
- 40 - HINSHELWOOD (C.N.): Endeavour 1949 - 8 - 151
- 41 - HOFFMAN-OSTENHOF (O.) et FELLNER-FELDEGG (H.): Oesterr
cheniker.Ztg. 1949 - 50 - 68
- 42 - HOFFMAN-OSTENHOF (O.) et FELLNER-FELDEGG (H.): Experientia
1947 - 8 - 123
- 42Bis - HOFFMANN (R.K.) et PHILLIPS (C.R.): Ann.N.Y.Acad.sci. 1950 -
53 - 62
- 43 - HOTCHKISS (R.D.) Ann.N.Y.Acad.Sci. 1946 - 46 - 479
- 44 - HUANG-HUANG-GHU et HUANG (T.F.) An.J.Trop.Med. 1948 - 28 - 361
- 45 - HULLSTRUNG (H.) et BEHM (R.): Dermatologische Woch. 1949 - 120 -
161, in Presse médicale 1950 p. 193
- 46 - IVANOVICS (G.): Schweiz.Ztschr.Path.u.Bakt. 1948 - 11 - 54
- 47 - IVANOVICS (G.): Orvosi Hetilap. Budapest 1949 - 90/10 - 289
in Excerpta.Med. 1950 - 3 - 112
- 48 - JALILI (M.A.): Nature 1946 - 157 - 731
- 49 - KALMANSON (G.M.): J.Bact. 1940 - 40 - 187
- 50 - KIRBY (H.): Proc.Soc.exp.Biol.Med. 1943 - 53 - 109
- 51 - KLINEFELTER (H.F.): Proc.Soc.exp.Biol.Med. 1941 - 46 - 591
- 52 - KNAPP (W.) : Z.Hyg.Dtsch. 1949 - 129 - 119
- 53 - KNIGHT (B.C.J.G.): Brit.J.exp.Path. 1935 - 16 - 315
- 54 - KNIGHT (B.C.J.G.): Bioch.J. 1937 - 31 - 966
- 55 - KOHN (H.I.): Ann.N.Y.Acad.Sci. 1943 - 44 - 503
- 56 - KOHN (H.I.) et HARRIS (J.S.): J.Pharmacol. 1943 - 77 - 16
- 57 - LALONDE (A.A.) et GARDNER (W.J.): J.am.Med.Ass. 1948 - 138 - 406
- 58 - LAMANNA (C.) et SHAPIRO (I.M.): J.Bact. 1943 - 45 - 385
- 59 - LANDY (M.) et STREIGHTOFF (F.): Proc.Soc.exp.Biol.Med. 1943 -
52 - 127

- 60 - LASSEUR (Ph.), DUPAIX (A.) et OLIVIER (M.): Trav. Labo. Microbio.
Faculté Pharmacie Nancy 1931-4-139 à 210
- 61 - LEE (S.W.) EPSTEIN (S.A.) et FOLEY (E.J.): Proc. Soc. exp. Biol.
Med. 1943 - 53 - 105
- 62 - LEHMAN (H.): Schweiz. Apot. Ztg. 1948 - 86 - 245
- 63 - LOEPER (M.): Thérapeutiques associées. Paris. Masson. éd. 1942
- 64 - LWOFF (M.) et MOREL (M.): Ann. Inst. Past. 1942 - 68 - 323
- 65 - MAC LEOD (C.M.): J. Exp. Med. 1940 - 72 - 217
- 66 - MARCHAL (J.G.) THOMAS (P.) et MASSIGNON (C.): Trav. Labo.
Microbio. Faculté Pharmacie Nancy 1948-49 - 16 - 128
- 67 - MARINI-BETTOLO (G.B.): Ric. sci. Riscata. Ital. 1946 - 16 - 303
- 68 - MARKEES (S.): Schweiz. Ztschr. f. Path. u. Bakt. 1946 - 9 - 88
- 69 - MARMORI : Boll. Inst. Sieroter. Milan. 1944 - 23 - 87
- 70 - MARTIN (G.J.): Can. Pharm. J. 1947 - 80 - 714
- 71 - MARTIN (G.) et FISCHER (C.V.): J. biol. Chem. 1942 - 144 - 289
- 72 - MASSART (L.): Exposés. ann. Biochimie 1949 - II - 133
- 73 - MASSI (L.): Boll. Soc. Ital. Biol. sper. 1946 - 22 - 141
- 74 - MELLON (R.R.), LOCKE (A.P.) et SHINN (L.E.): An. J. Med. Sci.
1940 - 199 - 749
- 75 - MOURIQUAND (G.) EDEL (V.) et MARAL (R.): C. R. Acad. Sci. 1946 -
222 - 702
- 76 - NETER (E.): J. Pharmacol. 1942 - 74 - 52
- 77 - NETER (E.): An. J. Surgery 1943 - 58 - 69
- 78 - NETER (E.): Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1941 - 47 - 303
- 79 - NETER (E.) et LOOMIS (A.T.): Urol. Cutaneous Rev. 1941-45-295
- 80 - NEUMANN (F.): Schweiz. Ztschr. f. Path. u. Bakt. 1946-9-419 et 426
- 81 - NORTON (L.L.) et ENGLE (F.B.): J. an. Med. Ass. 1948-136-37
- 82 - OLSON (M.) SLIDER (E.) CLARK (W.G.) et MAC DONALD (R.)
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 1942 - 49 - 396
- 83 - PARMENTIER (R.): C. R. Soc. Biol. 1949 - 143 - 585
- 84 - PARMENTIER (R.) et DUSTIN (P.J.): Nature - 1948-161-527
- 85 - PELNER (L.): N. Y. J. Med. 1943 43 1874 in Bull. anal. 1949 p. 1577
- 86 - PORTER (J.R.) et PELCZAR (M. J. Jr): J. Bact. 1941 - 41 - 173
- 87 - POUCHOL (J.): Thèse Pharmacie, Nancy, 1950
- 88 - REGNIER (J.) et LAMBIN (S.): C. R. Soc. Biol. 1941 - 135 - 267
- 89 - RIBAS (I.) et SOANE (E.): An. Soc. Esp. Fis. Y. Quimie 1949 - 45 -
599 in Produits pharmac. 1950 p. 157

- 90 - ROBLIN (R.O.) LAMPEN (J.O.) ENGLISH, COLE et VAUGHAN. J.
An.Chem.Soc. 1945 - 67 - 290
- 91 - RODIGHIERO (G.): Ann.Chim.appl.Ital. 1949 - 39 - 27
- 92 - ROSENTHAL (S.M.) et BAUER (H.): U.S.publ.Health.Repts.
1939 - 54 - 1880
- 93 - SANNIE (Ch.): Exposés ann.Biochimie 1946 - 6 - 225
- 94 - SCALFI (L.) et BOZZO (A.): Boll.Soc.Ital.Biol.sper. 1948 - 24 - 39
- 95 - SCALFI (L.) LEONARDI (G.) et CAMPUS (F.): Boll.Soc.Ital.
Biol.Sper. 1948 - 24 - 47
- 96 - SCANGA (F.): Sem.Hôpitaux Paris 1948 - 24 - 2234
- 97 - SEVAG (M.G.) et GREEN (M.N.): J.Bact. 1944 - 48 - 615, 623 et 631
- 98 - SEVAG (M.G.) SHELLBURNE (M.) et MUDD (S.): J.Bact. 1945 -
49 - 65
- 99 - SEVAG (M.G.): Advances in Enzymologia. 1946 - 6 - 63
- 100 - SCHMELKES (F.C.) et WYSS (O.): J.Bact. 1942 - 43 - 71
- 101 - SCHMELKES (F.C.) et WYSS (O.): Proc.Soc.exp.Biol.Med.
1942 - 49 - 263
- 102 - SCHMELKES (F.C.) WYSS (O.), MARKS (H.C.) LUDWIG (B.J.)
STRANDSKOV (F.B.) BELLEVILLE (N.J.): Proc.Soc.exp.Biol.
Med. 1942 - 50 - 145
- 103 - SCHMIDT (L.H.) RUEGSEGGER (J.M.) SESLER (C.L.) et HAMBURGER
(M.): J.Pharmacol. 1941 - 73 - 468
- 104 - SCHMIDT (L.H.) et HUGUES (H.B.): J.Pharmacol. 1944 - 81 - 43
- 105 - SCHNITKER (L.H.) et LENHOFF (C.D.): J.Lab.clin.Med. 1944 - 29 - 88
- 106 - SCHOPFER (W.H.): Bull.Soc.Chin.biol. 1948 - 30 - 748
- 107 - SCHULER (W.) et MEIER (R.): Helv.Physiol.Pharm.Acta 1944 -
2 - 83
- 108 - SESLER (C.L.) et SCHMIDT (L.H.): J.Pharmacol. 1943 - 79 - 117
- 109 - SMITH .J.Pharm.a.exp.Thérap. 1949 - 97 - 353
- 110 - SNELL (E.E.) et MITCHELL (H.K.): Archiv.Biochem. 1942 - I - 93
- 111 - STRAKOSCH (E.A.) et CLARK (W.G.): Bull.Inst.Past 1940 - 43 - 126
- 112 - STANIER (M.W.) Bact.Rev. 1950 - 14 - 181
- 113 - TENENBERG (D.J.) TSUCHIYA (H.M.) CLARK (W.G.) et STRAKOSCH
(E.A.) Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 50 - 262
- 114 - TENENBERG (D.J.) TSUCHIYA (H.M.) CLARK (W.G.) et STRAKOSCH
(E.A.) Proc.Soc.exp.Biol.Med. 1942 - 51 - 247
- 115 - UNTERBERGER (S.): Wien.Med.Woch. 1948 - 98 - 430
- 116 - VAN EULER (H.): Ztschr.physiol.Chem. 1943 - 279 - 175
- 117 - VAN LINT et ALAERTS: Brux.Med. 1949 - 29 N° 34 in Produits
Pharm. 1949 N° II - 495

- II8 - VECCHIO (G.Del.) VECCHIO (V.Del.) et ARGENZIANO (R.):
Boll.Soc.Ital.Biol.sper. 1946 - 22 - 4
- II9 - VECCHIO (G.Del.) VECCHIO (V.Del.) et ARGENZIANO (R.):
Boll.Soc.Ital.Biol.sper. 1948 - 24 - I90
- I20 - VESELL (H.) GROSS (I.H.) et SUSSMAN (R.M.): J.Lab.Clin.
Med.1946 - 31 - 444
- I21 - VIGOUROUX (J.) et LEYTON (G.): J.Bact. 1946 - 51 - 605
- I22 - WATTIE (E.) et BUTTERFIELD (C.T.): J.Bact. 1944 - 47 - 444
- I23 - WEINSTEIN (L.) et MAC DONALD (A.): J.Immunol. U.S.A.
1946 - 54 - I45
- I24 - WHITE (H.J.) LITCHFIELD (J.R.) et MARSHALL (E.K.): J.
Pharmacol. 1941 - 73 - IO4
- I25 - WHITE (H.J.) LITCHFIELD (J.R.) MARSHALL (E.K.) et BRATTON
(A.C.): J.Pharmacol. 1941 - 72 - II2
- I26 - WOJAHN (H.): Pharmazie 1948 - 3 - 254
- I27 - WOODS (D.D.) et FILDES (P.): Chemistry and Industry, 1940-
59 - I33
- I28 - WOODS (D.D.) et FILDES (P.): Brit.J.exp.Path. 1940-21-74
- I29 - WYSS (O.): Annual.Rev.of.Microbiology 1948 p. 421
- I30 - ZUNZ (E.): Eléments de Pharmacodynamie générale. Paris
Masson éd. 1930
- I31 - ZUNZ (E.): Bull.Soc.Chim.Belges 1948 - 47 - 59

VU :

Nancy, le 4 Décembre 1950

Le Président de Thèse :

Prof.F.KAYSER

VU ET APPROUVE,

Nancy, le 4 décembre 1950.

le Doyen de la Faculté:

Prof.G.RICHARD.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER:

NANCY, le 5 DEC. 1950

Le Recteur d'Académie, Président du Conseil
de l'Université:

J.CAPELLE

